

**Evaluierung des Einflusses von Stressproteinen
auf das frühe Überleben isolierter Inselzellen in
einem inflammatorischen Milieu**

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des
Grades eines Doktors der Medizin des
Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-
Universität Gießen

Eingereicht von
Vidya Maataoui
aus Offenbach am Main
Gießen, 2008

Aus der Medizinischen Klinik III und Poliklinik
Des Medizinischen Zentrums für Innere Medizin
Der Justus-Liebig-Universität Giessen

Direktor: Professor Dr. med. R.G. Bretzel

Gutachter: Professor Dr. med. Bretzel

Gutachter: Frau PD Dr. Lips

Tag der Disputation: 13.03.2009

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Angaben beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Meiner geliebten Familie
vielen Dank für alles Mama, Papa,
Adel, Arun und kleiner Schatz

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	11
2. Material und Methoden	
2.1 Materialien	29
2.1.1 Reagenzien	29
2.1.2 Antikörper	30
2.1.3 Lösungen und Puffer	31
2.2 Methoden	34
2.2.1 Isolierung Langerhansscher Inselzellen aus porzinen Pankreata	34
2.2.2 Hyperthermische Vorbehandlung	35
2.2.3 Inkubation in Wasserstoffperoxid	36
2.2.4 Inkubation in Stickoxid-Donatoren	36
2.2.5 Inkubation in Zytokinkombinationen	36
2.2.6 Vorbehandlung der Inselzellen mit Ac-DEVD-Chloromethyl Ketone	38
2.2.7 Vorbehandlung der Inselzellen mit N-Acetyl-Cystein (NAC)	38
2.2.8 Insulinextraktion	39

2.2.9 Western Blot Analyse	39
2.2.10 Färbung der Apoptosestadien	43
2.2.11 Statistische Datenanalyse	44
3. Ergebnisse	45
3.1 Versuchsablauf	45
3.2 Auswirkung von moderater und starker und Hyperthermie auf die Protein- expression isolierter Inselzellen	46
3.2.1 Auswirkungen von moderatem und starkem Stress auf die Expression von Hitzeschockproteinen	46
3.2.2 Auswirkung von moderater und starker Hyperthermie auf die Expression pro- und anti- apoptotischer Proteine	48
3.3 Einfluß einer hyperthermen Präkonditionierung auf das Überleben von Inselzellen in einem inflammatorischen Milieu	58

3.3.1	Resistenz hypertherm vorbehandelter Inselzellen gegenüber Wasserstoff- peroxid, Stickoxid und Zytokinen	58
3.4	Einfluss von DEVD-CMK und NAC auf die Expression pro- und antiapoptotischer Proteine nach hyperthermer Vorbehandlung	69
3.4.1.	Effekt von DEVD-CMK	69
3.4.1.1	Effekt auf die pro- und anti- apoptotischen Proteine Bax und Bcl-2	69
3.4.1.2	Wirkung auf die Caspase-3 und DFF Expression	73
3.4.1.3	Wirkung auf die Expression der Hitzeschockproteine 27,70 und 90	77
3.4.2	Wirkungen von N-Acetyl-Cystein	81
3.4.2.1	Wirkung auf die pro- und antiapoptotisch wirksamen Proteine Bax und Bcl-2	81
3.4.2.2	Wirkung auf die Caspase-3 und DFF Expression	83
3.4.2.3	Wirkung auf die Expression der Hitzeschockproteine 27, 70 und 90	85

4. Diskussion	87
4.1 Auswirkungen moderater und starker Hyperthermie auf die Proteinexpression isolierter Inselzellen	91
4.2 Einfluß einer hyperthermen Präkonditionierung auf das Überleben von Inselzellen in einem inflammatorischen Milieu	97
4.3 Einfluss von DEVD-CMK und NAC auf die Expression pro- und antiapoptotischer Proteine nach hyperthermer Vorbehandlung	102
5. Zusammenfassung	108
6. Summary	111
7. Referenzen	113
8. Anhang	133
8.1 Abkürzungen	133
8.2 Tabellen	134
8.3 Abbildungen	135

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in
folgenden Publikationen veröffentlicht:

1. Brandhorst D, Brandhorst H, Kumarasamy V, Maataoui A, Brendel MD, Bretzel RG.
Heat-exposed pig islets are protected from inflammatory mediators but express proapoptotic proteins [Transplant Proc. 2003 Sep;35(6):2139].
2. Brandhorst H, Brandhorst D, Kumarasamy V, Maataoui A, Brendel MD, Bretzel RG.
Pretreatment of isolated islets with caspase-3 inhibitor DEVD increases graft survival after xenotransplantation [Transplant Proc. 2003 Sep;35(6):2142].
3. Brandhorst D, Brandhorst H, Kumarasamy V, Maataoui A, Alt A, Brendel MD, Bretzel RG.

Hyperthermic preconditioning protects pig islet grafts from early inflammation but enhances rejection in immunocompetent mice [Cell Transplant. 2003;12(8):859-65].

4. Brandhorst D, Kumarasamy V, Maataoui A, Alt A, Bretzel RG, Brandhorst H.
Porcine islet graft function is affected by pretreatment with a caspase-3 inhibitor [Cell Transplant. 2006;15(4):311-7].

1. Einleitung

Die Zivilisationskrankheit Diabetes mellitus (DM) ist eine chronische Erkrankung, die in den vergangenen Jahrzehnten eine stetige Zunahme von Erkrankungsprävalenz und –inzidenz zeigt [1]. Die beiden häufigsten, pathogenetisch unterschiedlichen, Formen sind der insulinabhängige Typ 1 (insulin dependant diabetes mellitus: IDDM) und der insulinunabhängige Typ 2 (non insulin dependant diabetes mellitus: NIDDM) Diabetes mellitus.

Weltweit unterliegt die Prävalenz des Diabetes mellitus geographischen Schwankungen. So weisen beispielsweise die skandinavischen Länder hinsichtlich der Prävalenz des Typ 1 Diabetes mellitus die höchsten Werte auf (Inzidenz: 35/100000/Jahr), während Gebiete des pazifischen Raumes deutlich geringere Prävalenzen zeigen (Japan/China, Inzidenz: 1-3/100000/Jahr) [2-4]. Die Prävalenz aller Diabetesformen in der

Bundesrepublik Deutschland wird aktuell mit ca. 5% [1] angegeben.

Nach ätiologischen Gesichtspunkten werden im Wesentlichen zwei Formen des Diabetes mellitus unterschieden: der NIDDM sowie der IDDM. Beiden gemeinsam ist das Unvermögen des Organismus die Homöostase des Glucosehaushaltes zu gewährleisten. Hinsichtlich pathoätiologischer Aspekte bestehen allerdings wesentliche Unterschiede, wobei letztendlich die Entgleisung des Glucosestoffwechsels mit den sich ergebenden Konsequenzen im Mittelpunkt der Erkrankung steht.

In Deutschland leiden 95% der Diabetiker am Diabetes mellitus Typ 2 – bzw. dem Altersdiabetes [1]. Pathophysiologisch ist die Entstehung des NIDDM eng an eine periphere Insulinresistenz, gekoppelt an eine gestörte Insulin-Sekretionskinetik des Pankreas, gebunden. Ursache der Insulinresistenz ist zumeist ein signifikantes

Übergewicht der Betroffenen, das durch die gestörte Sekretionskinetik weiter gefördert wird.

Das Durchbrechen dieses Circulus vitiosus stellt in der Vielzahl der Fälle den primären therapeutischen Ansatz dar. Gewichtsreduktion, Sport sowie das konsequente Einhalten spezieller Diäten führt in vielen Fällen zu einer akzeptablen Blutzuckereinstellung. In fortgeschrittenen Krankheitsstadien oder bei fehlender Compliance des Patienten stehen orale Antidiabetika und letztendlich die Insulinsubstitution im Vordergrund der Therapie.

5% der in Deutschland lebenden Diabetiker leiden an der juvenilen Form (Typ 1) dieser Stoffwechselkrankheit [1]. Prädiktiven Wert besitzen genetische Faktoren wie die HLA-Merkmale DR 3 und DR 4, welche bei über 90% der Erkrankten positiv sind [5].

Definiert als Insulinmangelsyndrom, liegt ätiologisch die gezielte Zerstörung der Insulinproduzierenden

β -Zellen des Pankreas, im Rahmen einer Autoimmuninsulinitis, zugrunde. Für eine floride Inflammation des Inselzellapparates sprechen folgende Befunde:

1. Infiltration der Inselzellen mit autoreaktiven T-Lymphozyten.
2. Remission unter immunsuppressiver Therapie.
3. Nachweis von Inselzell-Autoantikörpern (ICA = islet cell autoantibodies).

Mit der Manifestation des Typ I Diabetes mellitus, und dem damit verbundenen absoluten Insulinmangel, wird eine regelmäßige Substitution von außen notwendig.

Mit der Einführung des Insulins durch Banting und Best im Jahr 1922 wurde die Therapie des Diabetes revolutioniert [6]. Im Verlauf haben sich im Wesentlichen zwei unterschiedliche Therapieansätze etabliert:

1. Das konventionelle Therapieschema:

Zu definierten Zeiten erfolgt die Injektion definierter Mengen von Insulin. Durch die vorgegebenen Zeitintervalle ist der Patient an einen unflexiblen Diätplan gebunden, dem er seinen Tagesablauf unterordnen muss. Einfache Handhabungsfehler können leicht zu einer Stoffwechselentgleisung führen [7].

2. Das intensivierte Therapieschema:

Gekennzeichnet durch das Basis-Bolus Prinzip erfolgt eine flexible Anpassung der jeweils zu injizierenden Menge Insulin an die geplante Nahrungsaufnahme. Durch die größere Flexibilität wird für den Patienten das Gestalten seines normalen Tagesablaufes wesentlich vereinfacht. Die angestrebte Annäherung an physiologische Verhältnisse führt allerdings häufig zu hypoglykämischen Stoffwechselentgleisungen, der gefürchtesten Komplikation im Rahmen der intensivierten Insulintherapie [7].

Unabhängig vom verwendeten Therapieschema konnten bisher noch keine ausreichend zufrieden stellenden Langzeitergebnisse erreicht werden. Während vor Beginn der Insulin-Ära die hyperglykämische Entgleisung, das diabetische Koma, die bei weitem häufigste Todesursache des Typ 1 Diabetikers war, werden heute Lebenserwartung und Lebensqualität zum größten Teil durch die Entwicklung sowie den Verlauf von Spätkomplikationen an Herz- und Gefäßsystem [8], Augen [9], Nieren und Nervensystem [10, 11] bestimmt. Als histopathologisches Korrelat stehen die Veränderungen im Rahmen der diabetischen Mikro- und Makroangiopathie im Vordergrund.

Ziel und Aufgabe einer modernen Diabetestherapie ist aus den genannten Gründen im Wesentlichen die Vermeidung der Entwicklung von Spätschäden. Dafür unabdingbar ist eine langfristig gute, physiologische Einstellung des Glukosestoffwechsels. Zu diesem Zweck hat die moderne Forschung in den letzten Jahren und

Jahrzehnten im Wesentlichen zwei Therapieansätze verfolgt:

1. Den Ersatz des funktionsunfähigen Organs durch eine Organtransplantation.
2. Den Ersatz des endokrinen Organanteiles durch die Transplantation isolierter Inselzellen in einer ausreichenden Anzahl.

Der Ersatz des funktionsunfähigen Inselzellapparates durch die Pankreasorgan- bzw. die Inselzelltransplantation ist bis heute die einzige Alternative, die langfristig eine ausreichende Stoffwechseleinstellung, unabhängig von einer externen Insulinapplikation, gewährleistet [12, 13]. Als Langzeit- und Kontrollparameter dient dabei der glykolisierte Anteil des Hämoglobins (HbA_{1c}). Einschränkungen erfahren beide Alternativen durch das ausgewählte Patientenkollektiv dem diese Verfahren heutzutage zur Verfügung gestellt werden können. So finden fast ausschließlich

Patienten die auf eine Nierentransplantation warten bzw. bereits nierentransplantiert sind und somit ohnehin lebenslang immunsuppressiv behandelt werden müssen Berücksichtigung. Patienten die unter rezidivierenden, hypoglykämischen Episoden leiden, die mit Hilfe der oben genannten Insulinschemata nicht zu beherrschen sind, können ebenfalls von den Transplantationsverfahren profitieren.

Ersatz des funktionsunfähigen Organs durch eine Organtransplantation

Mit der Einführung der Pankreasorgantransplantation steht ein Verfahren zur Verfügung, welches heutzutage dank ständiger Weiterentwicklungen Ein-Jahres-Funktionsraten von bis zu 90% aufweist [14, 15]. Zumeist lässt sich bei den so behandelten Diabetikern eine Insulinunabhängigkeit erreichen [16], was wesentlich zur Steigerung der subjektiv empfunden Lebensqualität beiträgt. Schwerwiegender im positiven Sinne sind die objektivierbaren Einflüsse

einer Pankreasorgantransplantation auf den Langzeitverlauf der Erkrankung zu bewerten. So konnte nachgewiesen werden, dass der Progress von Sekundärkomplikation signifikant gehemmt werden konnte, bzw. reversibel war [17-27].

Insgesamt profitiert der transplantierte Patient von einer signifikanten Verbesserung von Lebenserwartung [18, 23-27] und Lebensqualität [22].

Neben den genannten positiven Folgen einer Pankreasorgantransplantation ist der große, chirurgische Eingriff mit nicht unerheblichen Komplikationen sowohl peri- als auch postoperativ verbunden. Perioperativ sind alle bekannten Komplikationen bei Eingriffen in Vollnarkose zu nennen. Postoperativ stehen bei der Transplantation des Pankreas die von der Drainagetechnik des exokrinen Pankreas abhängigen Komplikationen im Vordergrund:

Bei Drainage des exokrinen Pankreas in die Blase können schwere, rezidivierende Harnwegsinfekte auftreten [28], die aufgrund der medikamentös beeinflussten Immunabwehr der Patienten in das Bild einer Urosepsis übergehen können. In schweren Fällen kann die Umwandlung in eine enterale Drainagetechnik notwendig werden, die wiederum Risiken bzw. Nachteile birgt. So hat die Anastomose der enteralen Drainage eine höhere Insuffizienzrate [28]. Zudem verzichtet man auf das einfache Monitoring der Transplantatfunktion durch die Analyse von Urinamylase und –lipase.

Zusätzlich können rezidivierende Pankreatitiden [28], Abstoßungsreaktionen, aber auch vaskuläre Komplikationen wie Thrombosen der Anschlussgefäße zur frühen Transplantatfehlfunktion und schließlich zum Transplantatverlust führen.

Ersatz des endokrinen Organanteiles durch die Transplantation isolierter Inselzellen

Aufgrund der beschriebenen Komplikationen, die mit der chirurgischen Pankreasorgantransplantation assoziiert sind, rückte die Transplantation des isolierten endokrinen Organanteiles vermehrt in den Mittelpunkt des Interesses. Dabei zeichnet sich das Verfahren durch folgende Vorteile gegenüber dem chirurgischen Verfahren aus:

- Einfache und schnelle, den Patient wenig belastende, Transplantation: Die zuvor isolierten Inselzellen werden über einen in der Vena porta platzierten Katheter in das Zielorgan (Leber) eingeschwemmt. Dort können sich die Inselzellen ansiedeln und ihre Funktion aufnehmen. Der minimalinvasive Eingriff wird in lokaler Betäubung vorgenommen und kann in aller Regel ambulant durchgeführt werden.

- Die Möglichkeit durch immunmodulatorische Maßnahmen die Immunogenität und Antigenität der Inselzellen vor Transplantation zu verringern, um so die Dosis der applizierten Immunsuppressiva nach Transplantation zu reduzieren [29].

Gerade die immunmodulatorischen Möglichkeiten im Vorfeld der Transplantation aber auch die immunsuppressiven Therapieansätze im Anschluss bieten dabei die Möglichkeit das Transplantationsergebnis wesentlich zu beeinflussen. So konnte in neueren Studien unter Anwendung der Makrolide Sirolimus und Tacrolimus sowie des monoklonalen Antikörpers Daclizumab, bei Vermeidung inseltoxischer Steroide, eine Insulinunabhängigkeit bei 100% der Patienten erreicht werden [30].

Neben der immunsuppressiven Therapie hat dabei die transplantierte Inselmasse einen wesentlichen Einfluss auf den Erfolg der Transplantation [31]. Im

Rahmen der genannten Studien wurden bis zu drei oder mehr Spenderorgane für einen Empfänger verarbeitet, um einen optimalen Transplantationserfolg zu erreichen.

Gründe für die benötigten, ausreichend großen Inselmassen für eine erfolgreiche Transplantation sind vor allem in den multiplen Stresssituationen, denen die Inselzellen vor, während und nach der Transplantation ausgesetzt sind, zu suchen. Neben zahlreichen Spenderfaktoren wie Zeitpunkt des Hirntodes, angewandter Organentnahmetechnik und Phasen der warmen und kalten Ischämie, sind es vor allem apoptotische und inflammatorische Mechanismen während der Zellisolation und nach transportaler Transplantation, die zu einem signifikanten Zelluntergang führen [32-35]:

- Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von endotoxinhaltigen Reagenzien während der Inselzellisolierung, wie z.B. Kollagenasen, Serum und Ficoll zu

einer Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen in den Inselzellen führt [36-39]. Die anschließende Kultivierung der Inselzellen führt nachweisbar zur Einleitung des programmierten Zelltodes, wobei der Anteil apoptotischer Zellen mit der Dauer der Kultivierung zunimmt [40].

- Unmittelbar nach transportaler Transplantation sind die Inselzellen in ihrem hepatischen Milieu unspezifischen inflammatorischen Einflüssen ausgesetzt [41]. Lokale Makrophagen, endotheliale Zellen und Hepatozyten führen über eine Sekretion von Zytokinen wie IL-1 β , IFN γ und TNF α sowie Stickoxid (NO) zur frühen Dysfunktion der Inselzellen. Versuche in Makrophagen-depletierten Tiermodellen sowie nach Inhibition des retikulohistiozytären Systems zeigten längere Überlebensphasen der Inselzellen [41-43].

- Der Blutkontakt nach erfolgter Transplantation führt zu der Präsentation von Gewebefaktoren (tissue factor) auf der Oberfläche der Inselzellen. Dies induziert primär eine Aktivierung des Komplementsystems sowie der Gerinnungskaskade und sekundär die Einwanderung von Thrombozyten und Leukozyten aus der Umgebung. Zusammenfassend werden diese Reaktionen unter dem Begriff der ‚Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction‘ (IBMIR) subsumiert. Eine frühe Dysfunktion der Inselzellen ist die Folge. Diese unmittelbaren Reaktionen scheinen auch durch eine suffiziente Immunsuppression nicht beeinflussbar, da auch T-Zell depletierte Empfänger frühe, unspezifische inflammatorische Reaktionen zeigen [44-47]. Der Einsatz niedermolekularen Dextransulfats resultiert allerdings sowohl in vitro als auch im Tiermodell in einem

protektiven Effekt gegenüber diesen frühen inflammatorischen Mechanismen, was zu signifikant verlängerten Überlebenszeiten der Inselzellen führt.

Zellen, die solchen Stresssituationen ausgesetzt sind, reagieren mit der Synthese von Hitzeschockproteinen, was ihnen das Überleben in einer sonst tödlichen Umgebung ermöglicht [48, 49]. So zeigen Inselzellen nach induzierter Hitzeschockproteinsynthese eine vermehrte Resistenz gegenüber Sauerstoffradikalen und Stickoxid. Grundlage für diesen protektiven Effekt scheint dabei die Verhinderung eines intrazellulären Energieverlustes zu sein [50-55].

Zeitgleich scheinen subletale Stresssituationen neben der vermehrten Expression von Hitzeschockproteinen auch die Expression proapoptotischer Proteine zu fördern. So konnte nachgewiesen werden, dass die Induktion von

Hitzeschockproteinen zu einer signifikant geringeren Wiedergewinnung initial transplantierten Insulins im Vergleich zu einer Vergleichsgruppe im Tiermodell führt. Gründe dafür sind am ehesten in einer erhöhten Apoptoserate sowie in einer erhöhten Immunogenität nach Präsentation der Hitzeschockproteine auf der Zelloberfläche zu suchen [52, 53].

Diese ambivalenten Ergebnisse zeigen, dass sowohl positive als auch negative Effekte mit der Induktion einer vermehrten Hitzeschockproteinsynthese zusammen hängen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluation des Einflusses unterschiedlicher Stresssituationen auf die Expression pro- und antiapoptotischer Proteine sowie die Untersuchung der protektiven Potenz gegenüber unterschiedlichen Noxen und deren Kombinationen. Dafür wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Unterschiede in der Synthese von Hitzeschockproteinen bzw. pro- und antiapoptotischen Proteinen auf Antwort auf unterschiedlich starken Stress in Form von Hyperthermie.
- Einfluss einer hyperthermen Präkonditionierung auf das Überleben von Inselzellen in einem inflammatorischen Milieu.
- Einfluss der Caspasehemmer Acetyl-DEVD-Chloromethyl-Ketone (Ac-DEVD-CMK) und N-Acetylcystein (NAC) auf die Expression pro- und antiapoptotischer Proteine nach hyperthermer Vorbehandlung.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien

- Alkohol 80%, vergällt, Apotheke des Universitätsklinikums Giessen
- Aqua bidest., Pfrimer & Co
- Hank's solution, steril, Gibco Ltd., Scotland
- Isotone Kochsalzlösung, 0,9% NaCl, Pfrimmer & Co
- Kollagenase vom Cl. histiolitikum, lyophilisiert, reinst, 0,77 U/mg,
- Natriumhydrogencarbonat, steril, Braun Melsungen
- Nembutal(r), (Pentobarbital-Natrium, 60 mg/dl)
- Ac-DEVD-Chloromethyl Ketone (CMK)

2.1.2. Antikörper

1. Primärantikörper

- Anti-Human HSP-90
Stressgen Biomol, Hamburg
- Anti-Human HSP-70
ABR Dianova, Hamburg
- Anti Fas and FasL
Pharmingen, Heidelberg
- Anti-Human Bax, Bcl-2, HSP-60, HSP-27, iNOS
Stressgen Biomol, Hamburg
- Anti-Human DFF
Pharmingen, Heidelberg
- Anti-Human HO-1
Santa Cruz, Heidelberg

2. Sekundärantikörper

- Anti- Maus
Dako, Hamburg

2.1.3. Lösungen und Puffer

SDS Puffer:

- 100 µl Glycerol
- 125 µl Tris Puffer (0,5 M, pH 6,8)
- 200 µl SDS Gel (10%)
- 475 µl Aqua destillata

HBSS (Hank's Gebrauchslösung: Hanks balanced salt solution):

- 10 ml Penicillin-Streptomycin
- 100 ml HBSS (10x)
- ca. 3-5 ml Natriumhydrogencarbonat unter sterilen Bedingungen mit Aqua destillata ad 1L auffüllen

Insulin-Extraktions-Reagenz (Ziegler-Reagenz):

- 76 ml Äthanol (96%)
- 8 ml H_3PO_4 (1M)
- 4 ml Aqua destillata
- Lagerung bei 4°C

IRI-Puffer:

- 4,7g Na_2HPO_4
- 6g NaCl
- 3g Humanalbumin
- 0.2 g NaN_3
- ad 1000 ml Aqua destillata
- Lagerung bei 4°C

Medium 199 (TCM):

- 5% Fetal Calf serum (FCS)
- 10% Porcine Serum
- 2 mM N-acetyl-L-alanyl-L-glutamine
- 20 ml Hepes
- 100 IU/ml Penicillin
- 100 µg/ml-Streptomycin (Biochrom, Berlin)
- 20 µg/ml ciprofloxacin (Bayer, Leverkusen)
- 900 ml Aqua destillata
- 100 ml Medium 199 (10x konz.)
- 0.45 ml NaOH (10 mol/L)

Material:

- Laborwaage, Mettler, Gießen
- Chirurgische Gesichtsmaske, Johnson & Johnson, Nordenstedt
- Einweghandschuhe, Peha-taft, Hartmann, Heidenheim
- Einmalkanülen, steril, 26G, Braun Melsungen
- Einmalspritzen, steril, 1ml, Braun Melsungen
- Eppendorf-Gefäße, Eppendorf, Hamburg
- Präpariertes Blue cap mit Stopfen zur Fixation des Schwanzes
- Zellstoff und Tupfer, Pur Zellin, Hartmann, Hamburg

Weitere verwendete Materialien und Geräte werden im jeweiligen Unterkapitel der Methoden näher erläutert.

2.2 Methoden

2.2.1. Isolierung Langerhansscher Inselzellen aus porzinen Pankreata

Spender

Als Spenderorgane für die Gewinnung der Langerhansschen Inselzellen wurden porzine Pankreata verwandt. Die porzinen Spenderorgane stammen ausschließlich von adulten (>2 Jahre) weiblichen Zuchtschweinen, die aufgrund von Fertilitätsstörungen oder anderer körperlicher Gebrechen aus der Zucht ausgeschlossen wurden.

Verfahren der Inselzellisolierung

Die Inselzellen wurden wie von Brandhorst et al. beschrieben isoliert [56, 57].

Die Quantifizierung der isolierten Inselmasse erfolgte durch Berechnung der Inseläquivalenzzahl (islet equivalent number, IEQ). Für die Versuche

wurden die Inselzellen in Petrischalen aliquotiert [58].

2.2.2 Hyperthermische Vorbehandlung

Die frisch isolierten, purifizierten (Reinheitsgrad >90%) Inselzellen wurden während der hyperthermen Behandlung in bikarbonatfreiem Medium 199 inkubiert.

Hierzu wurden quantifizierte Aliquots (2000 IEQ) frisch isolierter, gereinigter Inselzellen in Flachbodengläschen (VWR intern., Frankfurt a.M.) mit TCM 199 (1 ml) gefüllt. Diese wurden über einen Zeitraum von 80 min. in einem Wasserbad bei $43^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (definiert als starker Stress), oder bei $41^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (definiert als moderater Stress) inkubiert, bevor sie sich in einem Brutschrank bei 37°C in CO_2 -freier Atmosphäre über einen Zeitraum von 18 h regenerierten.

Parallel dazu wurden Kontrollinseln kontinuierlich bei 37°C im Brutschrank scheinbehandelt.

2.2.3 Inkubation in Wasserstoffperoxid

Quantifizierte Aliquots (2000 IEQ) frisch isolierter, gereinigter (Reinheitsgrad >90%) porziner Inselzellen wurden zur Evaluierung der Resistenz nach hyperthermischer Vorbehandlung in ansteigenden Konzentrationen Wasserstoffperoxid (H₂O₂) (0.1 mM, 0.2 mM, 0.3 mM, 0.4 mM, 0.5 mM) für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Viabilität (2.2.1) sowie die Bestimmung des Insulingehaltes im Rahmen der Insulinwiederfindung (2.2.8).

2.2.4 Inkubation in Stickoxid-Donatoren

Quantifizierte Aliquots (2000 IEQ) frisch isolierter, gereinigter (Reinheitsgrad >90%) porziner Inselzellen wurden zur Evaluierung der Resistenz nach hyperthermischer Vorbehandlung in ansteigenden Konzentrationen Stickoxid (0.2 mM, 0.4 mM, 0.6 mM, 0.8 mM, 1.0 mM, 1.2 mM) für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss erfolgte die

Bestimmung der Viabilität (2.2.1) sowie die Bestimmung des Insulingehaltes im Rahmen der Insulinwiederfindung (2.2.8).

2.2.5 Inkubation in Zytokinkombinationen

Quantifizierte Aliquots (2000 IEQ) frisch isolierter, gereinigter (Reinheitsgrad >90%) porziner Inselzellen wurden zur Evaluierung der Resistenz nach hyperthermischer Vorbehandlung in unterschiedlichen Zytokinkombinationen für 48 Stunden inkubiert. Dabei kamen IL-1 β , IFN γ und TNF α in Konzentrationen von je 1000U/ml zum Einsatz. Die Behandlung erfolgte mit einzeln eingesetzten aber auch in Kombination verwendeten Zytokinen. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Viabilität (2.2.1), sowie die Bestimmung des Insulingehaltes im Rahmen der Insulinwiederfindung (2.2.8).

2.2.6 Vorbehandlung der Inselzellen mit Ac-DEVD-Chloromethyl Ketone

Quantifizierte Aliquots (2000 IEQ) frisch isolierter, gereinigter (Reinheitsgrad >90%) porziner Inselzellen wurden zur Evaluierung der inhibitorischen Potenz des irreversiblen Caspase-3 Hemmers Ac-DEVD-CMK (Calbiochem, Schwalbach, Germany) bei 37°C bzw. vor oder nach Hyperthermie (43°C) (2.2.2) vier Stunden in 200µM der Substanz inkubiert. Vor Weiterverarbeitung erfolgte eine zweimalige Spülung der vorbehandelten Inselzellen mittels PBS (phosphate buffered solution).

2.2.7 Vorbehandlung der Inselzellen mit N-Acetyl-Cystein (NAC)

Quantifizierte Aliquots (2000 IEQ) frisch isolierter, gereinigter (Reinheitsgrad >90%) porziner Inselzellen wurden zur Evaluierung der inhibitorischen Potenz des Apoptosehemmers N-

Acetyl-Cystein bei 37°C bzw. vor oder nach Hyperthermie (43°C) (2.2.2) vier Stunden in 125µM N-Acetyl-Cystein inkubiert. Vor Weiterverarbeitung erfolgte eine zweimalige Spülung der vorbehandelten Inselzellen mittels PBS.

2.2.8 Insulinextraktion

Im Anschluss an die Inkubation der Inselzellproben erfolgte die Insulinextraktion. Nach Homogenisierung der zu untersuchenden Probe mit einem Ultra-Turrax T8 (Jonke & Kunkel GmbH, Staufen) erfolgte eine Sonifizierung jeder Probe mit je 5 kurzen Impulsen (Power +315; Cycle 0.25). Nach Zentrifugation der Homogenisatproben (10 min, 4°C, 3000 x g) wurden 100 µl des Überstandes mit 900 µl IRI-Puffer neutralisiert.

Die Auswertung erfolgte nach Angaben des Herstellers mittels eines EIA-Kits (Enzyme Immunoassay; DRG Instruments GmbH, Marburg).

2.2.9 Western Blot Analyse

Die Analyse der exprimierten Proteine (Heat Shock Protein [HSP]-27, -60, -70, -90, Hämoxygenase I [HO-I], Bax, Bcl-2, Fas, Fas Ligand [FasL], induzierbare NO-Synthase [iNOS], Caspase-3, DNA Fragmentation Factor [DFF]) erfolgte mittels Western Blot nach Vorbehandlung und Aliquotierung der Inselzellen in Petrischalen.

Zunächst wurden die 2000 – 10000 IEQ mit kalten HBSS gewaschen und anschließend mit 500µl SDS verdünnt.

Nach Desintegration durch Sonifizierung (Power +315, Cycle 0.25) wurden die Proben zentrifugiert (4 min/3000xg/4°C). Der Überstand wurde abpipetiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die präparierten Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Im weiteren Verlauf der Analyse wurden die gefrorenen Proben im kochenden Wasserbad bei 95°C aufgetaut, um der SDS-Polyacrylamid-Gel-

Elektrophorese zugeführt werden zu können. Im Anschluss an den Transfer der Proteine wurden die PVDF - Filter (Millipore, Badford, USA) für 30 min. mit 5% nonfat dried milk (Sigma, Deisenhofen) blockiert, mit PBS Lösung gewaschen und für 90 min. mit folgenden Antikörper inkubiert:

1. Monoklonalen anti-humanen Antikörpern gegen HSP 90 (Stressgen, Biomol, Hamburg), HSP 70 (ABR, Dianova, Hamburg) und Fas und FasL (Pharmingen, Heidelberg).
2. Polyklonale anti-humane Antikörper gegen (Bax, Bcl-2, HSP 60, HSP 27, iNOS (Stressgen), DFF (Pharmingen) und HO-I (Santa Cruz, Heidelberg).

Nach einer weiteren Spülung mit PBS, versetzt mit 0,1% Tween-20, wurden die Filter für 60 min. in peroxidase-konjugiertem anti-Maus, anti-Kaninchen oder anti-Ziege Sekundär-Antikörper (1:10000, Dako, Hamburg) inkubiert. Im Anschluss an eine

letzte Spülung mit PBS, erfolgte die Entwicklung mit dem ECL-Detection System (Amersham, Braunschweig). Der entwickelte Film wurde gescannt und die Messung der Protein Expression in Arbitrary Units dargestellt ($AU = \text{area (mm}^2\text{)} \times \text{Stärke der Färbung}$). Unter Nutzung der Software AnalySIS (SIS, Stuttgart) wurde die Fläche und farbliche Dichte der Proteinbänder quantifiziert und in Relation zum eingesetzten Proteingehalt gesetzt, welcher durch den Detergent-Kompatiblen DC-II Assay für Mikro-Protein Determination (Bio-Rad, München) ermittelt wurde. Die relative Proteinexpression bezieht sich auf scheinbehandelte Kontrollinseln, die kontinuierlich bei 37°C inkubiert wurden.

2.2.10 Färbung der Apoptosestadien

Die Viabilität wurde in vitro durch eine Färbung mittels Trypanblau bestimmt.

Das Prinzip der Trypan-Blau Methode zur Bestimmung der Viabilität beruht darauf, dass Trypan-Blau von vitalen Zellen nicht aufgenommen wird, geschädigte oder avitale Zellen von diesem Farbstoff aber tiefblau gefärbt werden.

Werden Zellen nekrotisch und ihre Membran durchlässig, kann Annexin V in die Zellen eindringen und sich an die Innenseite der Membran binden. Daher können bei alleiniger Färbung von Zellen mit Annexin V apoptotische nicht von nekrotischen unterschieden werden.

Man kombiniert daher die Annexin V Markierung mit einer Propidiumiodidfärbung. Das Propidiumiodid (PI) dringt nur in Zellen mit durchlässiger Membran, also in nekrotische Zellen ein.

Lebende Zellen sind daher Annexin-negativ und PI-negativ, apoptotische Zellen sind Annexin positiv

und PI-negativ, nekrotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-positiv (siehe Tabelle 1).

2.2.11 Statistische Datenanalyse

1. Die Analyse verbundener Stichproben ($n > 2$) erfolgte mittels Friedman-Test. Bei Signifikanz der Ergebnisse ($p < 0.05$) erfolgte ein multipler Vergleich unter Anwendung des Wilcoxon-Tests.
2. Die Analyse nicht-verbundener Stichproben ($n > 2$) erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test. Bei Signifikanz der Ergebnisse ($p < 0.05$) erfolgte ein multipler Vergleich unter Anwendung des Mann-Whitney-Tests.

3. Ergebnisse

3. 1 Versuchsablauf

Ziel der vorliegenden Arbeit war es Methoden zu entwickeln, die das frühe Überleben von Langerhansschen Inselzellen in einem inflammatorischen Milieu verbessern.

Unter diesen Vorgaben wurden Inselzellen nach ihrer Isolation verschiedenen Stresssituationen ausgesetzt, um die Synthese von Stressproteinen zu induzieren. Anschließend wurden die Inselzellen in vitro verschiedenen Versuchsreihen unterzogen, um die möglichen Effekte der Vorbehandlung hinsichtlich einer größeren Resistenz gegenüber toxischen Noxen zu evaluieren.

Die Viabilität der Inselzellen sowie die Menge an wiedergewonnenem Insulin waren dabei die wesentlichen Untersuchungsparameter.

3.2 Auswirkung von moderater und starker Hyperthermie auf die Proteinexpression isolierter Inselzellen

3.2.1 Auswirkungen von moderatem und starkem Stress auf die Expression von Hitzeschockproteinen

Der Vergleich der Proteinexpression mittels Western-Blot-Analyse erbrachte für HSP-60 und HO-1 keine Beeinflussung durch moderate (41°C) oder starke (43°C) Hyperthermie.

Für HSP-27, HSP-70 und HSP-90 wurde eine signifikante, temperaturabhängige Hochregulation der basalen Proteinexpression von 3.57 ± 1.65 AU/ μ g, 13.34 ± 6.89 AU/ μ g und 2.44 ± 1.41 AU/ μ g nach Erhitzung der Inselzellen auf 41°C oder 43°C beobachtet (**Abb. 1**), welche für HSP-27 und HSP-70 besonders ausgeprägt war. Demgegenüber erschien die Überexpression von HSP-90 nach starker Hyperthermie im Vergleich zu moderater Hyperthermie nur gering ($P < 0.05$).

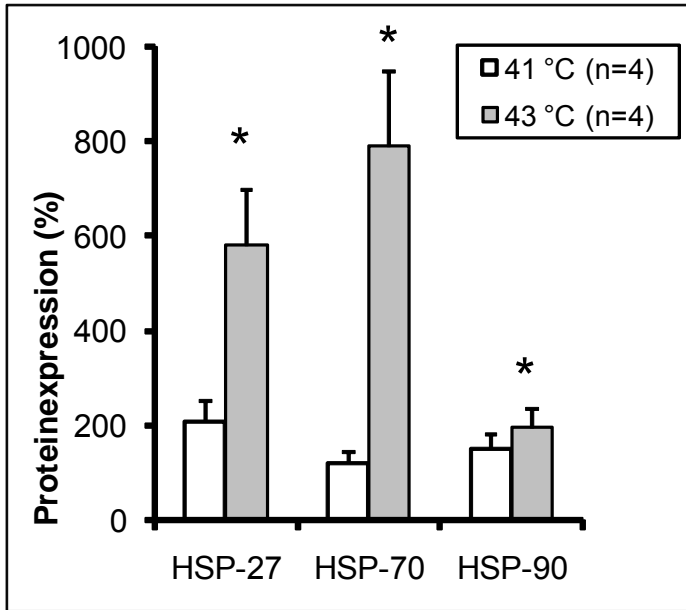


Abb.1 Einfluss von hyperthermen Stress auf den relativen Anstieg von HSP-27, -70 und -90 in Schweineinseln nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken). * $P < 0.05$ für 41°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

3.2.2 Auswirkung von moderater und starker Hyperthermie auf die Expression pro- und antiapoptotischer Proteine

Um die Auswirkung der Stressintensität auf die Induktion von Apoptose zu untersuchen, wurde die Expression von proapoptotischen Bax mit der von antiapoptotischen Bcl-2 nach moderaten und starken hyperthermen Stress verglichen.

Um frühe Marker von Apoptose nach 80minütiger Hitzeexposition (43°C) zu verifizieren, wurden sowohl Kontroll- als auch hitzebehandelte Inselzellen, nach einer 18stündigen Regeneration bei 37°C, einer Doppelfärbung mit Annexin V und PI unterzogen. Diese erlaubte eine Differenzierung zwischen frühen und späten Apoptosestadien (Tab. 1).

Tabelle 1 Unterscheidung früher und später Apoptosestadien mittels Doppelfärbung mit Annexin V und PI

	Annexin V	PI
frühe Apoptose	positiv	Negativ
späte Apoptose	positiv	Positiv
Nekrose	negativ	Positiv

Der Anteil Annexin V-positiv gefärbter und PI-negativer Inselzellen bei frisch isolierten Inselzellen lag bei $9.1 \pm 1.7\%$ ($n = 5$). Dieser erhöhte sich signifikant nach 37°C -Übernachtkultur auf $14.9 \pm 3.3\%$ ($*P < 0.05$ vs. basale Expression) und auf $12.2 \pm 4.1\%$ ($*P < 0.05$ vs. basale Expression) nach hyperthermer (43°C) Vorbehandlung der Inselzellen (**Abb. 2**).

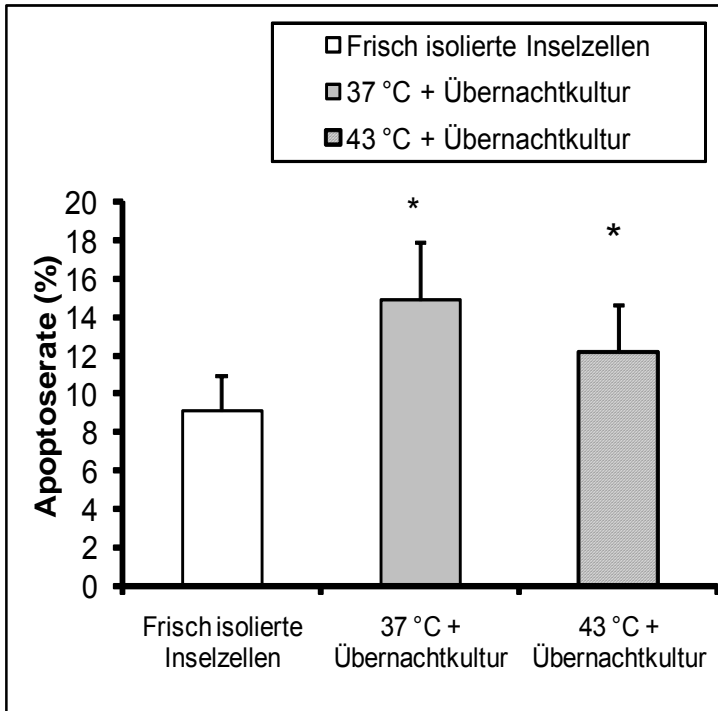


Abb.2 Frühe Apoptose (in %) scheinbehandelter (grauer Balken) bzw. hypertherm (43°C) vorbehandelter (gestreifter Balken) Inselzellen nach Übernachtkultur. Als Kontrolle diente die Apoptoserate frisch isolierter Inselzellen (weißer Balken). * $P < 0.05$ für 37°C bzw. 43°C vs. frisch isolierte Inselzellen.

Zwischen dem Anteil früh apoptotischer Inselzellen der Scheinbehandelten und hypertherm vorbehandelten Inselzellen bestand kein signifikanter Unterschied nach Übernachtskultur.

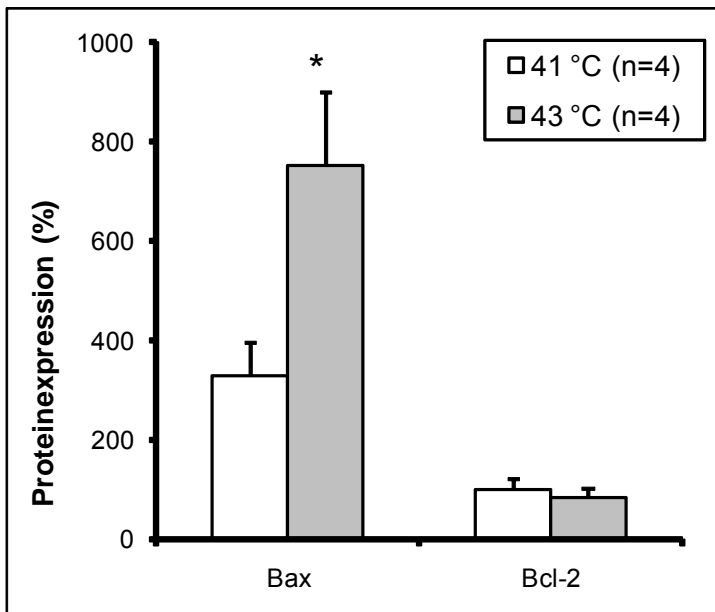


Abb. 3 Einfluss von hyperthermen Stress auf den relativen Anstieg von Bax und Bcl-2 in Schweineinseln nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken).

*P<0.05 für 41°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

Die basale Expression von Bcl-2 (1.27 ± 0.49 AU/ μ g) wurde weder durch moderaten noch durch starken hyperthermen Stress signifikant beeinflusst (**Abb. 3**).

Im Gegensatz dazu unterschied sich die basale (0.062 ± 0.044 AU/ μ g) Expression von Bax nach moderaten bzw. starken hyperthermen Stress signifikant (*P<0.05, **Abb. 3**).

Das korrespondierende Verhältnis von Bax zu Bcl-2 stieg entsprechend von 0.74 ± 0.59 nach moderater auf 1.67 ± 1.40 nach starker Hyperthermie signifikant an (*P<0.05; **Abb.4**).

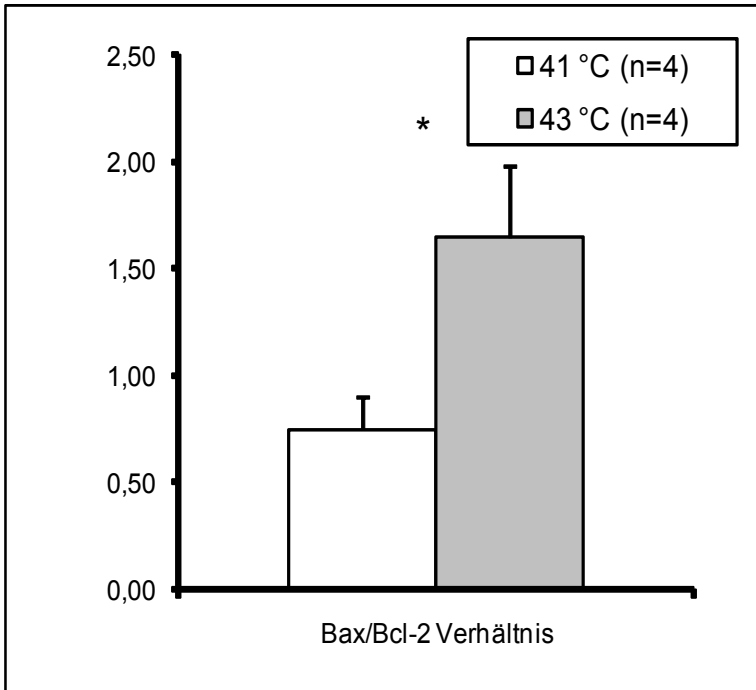


Abb.4 Einfluss von hyperthermen Stress auf das Bax/Bcl-2 Verhältnis nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken). *P<0.05 für 41°C vs. 43°C.

Entsprechend dem Anstieg der Bax-Expression, erhöhte sich die basale Expression der proapoptotischen Proteine Fas (0.91 ± 0.84 AU/ μ g)

und FasL (0.075 ± 0.036 AU/ μ g) nach starker Hyperthermie um annähernd das vier- bzw. dreifache. Dagegen wurde nach moderater Hyperthermie ein Absinken der Expression von Fas und FasL beobachtet (* $P < 0.05$, 41°C vs. 43°C, **Abb.5**).

Die Expression von iNOS nach Hyperthermie war vergleichbar mit der von Fas und FasL. Verglichen mit der basalen Expression (4.69 ± 3.94 AU/ μ g) stieg iNOS nach moderater Hyperthermie nicht, nach starker Hyperthermie geringfügig an (**Abb.5**).

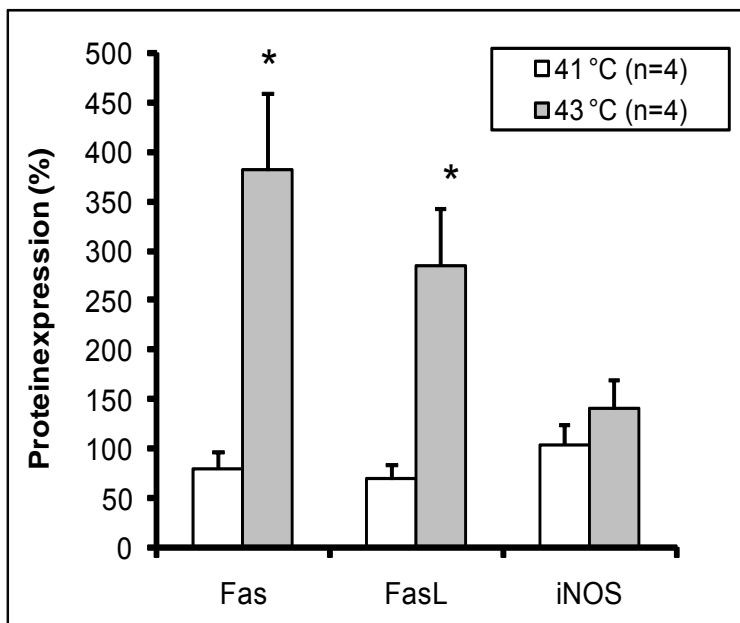


Abb. 5 Einfluss von hyperthermen Stress auf den relativen Anstieg von Fas, FasL und iNOS in Schweineinseln nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken). *P<0.05 für 41°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

Die Aktivität des apoptotischen Effektorproteins Caspase-3 bestätigte die oben beschriebenen

Ergebnisse. Während moderate Hyperthermie eine Erhöhung der basalen Caspase-3 Aktivität ($0.39 \pm 0.13 \text{ } \mu\text{M}/\mu\text{g}/\text{h}$) um mehr als die Hälfte induzierte, stieg nach starker Hyperthermie die Aktivität um das nahezu vierfache an (**Abb.6**).

DFF ist ein apoptotisches Effektorprotein, welches mittels Spaltung durch Caspase-3 aktiviert wird. Wie in **Abb.6** verdeutlicht, wurde die basale DFF Expression von $3.29 \pm 1.28 \text{ AU}/\mu\text{g}$ durch moderaten hyperthermen Stress nicht beeinflusst, während sie nach starkem hyperthermen Stress nahezu verdoppelt wurde (* $P < 0.05$, 43°C vs. 37°C). Der Unterschied erreichte dabei statistische Signifikanz (* $P < 0.05$, 41°C vs. 43°C).

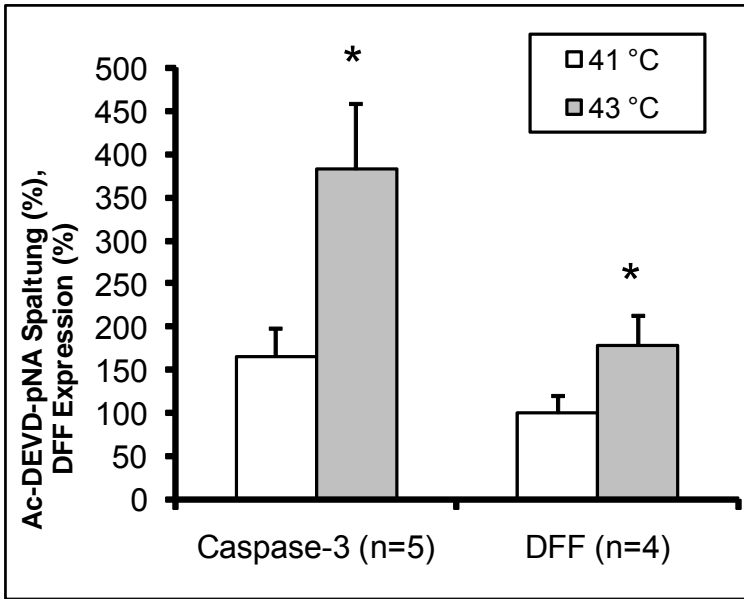


Abb.6 Einfluss von hyperthermen Stress auf den Anstieg der Caspase-3 Aktivität und Expression von DFF in Schweineinseln nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken). * $P < 0.05$ für 41°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

3.3. Einfluss einer hyperthermen Präkonditionierung auf das Überleben von Inselzellen in einem inflammatorischen Milieu

3.3.1 Resistenz hypertherm vorbehandelter Inselzellen gegenüber Wasserstoffperoxid, Stickoxid und Zytokinen

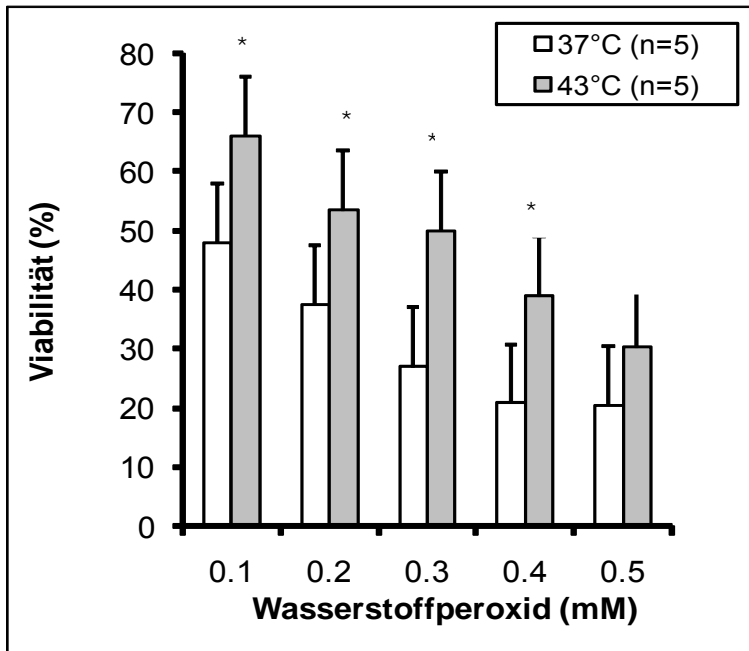


Abb.7 Trypanblauexklusion (%) von unbehandelten (weiße Balken) und hypertherm (graue Balken) vorbehandelten (hitzegechockten) Inselzellen nach 24stündiger Inkubation in H_2O_2 . Der relative Anteil von Trypanblau-negativen Zellen wurde auf die korrespondierenden Werte von unbehandelten bzw. hitzegechockten Inselzellen ohne Zusatz inflammatorischer Stimuli bezogen. * $P < 0.05$ für 37°C vs. 43°C .

Es zeigte sich eine kontinuierliche Verschlechterung der untersuchten Zellviabilität mit steigender Wasserstoffperoxid-Konzentration. Der positive Effekt einer hyperthermen Vorbehandlung konnte bei allen untersuchten Wasserstoffperoxid-Konzentrationen beobachtet werden. Der Unterschied erreichte bei allen Konzentrationen statistische Signifikanz (* $P < 0.05$ 37°C vs. 43°C).

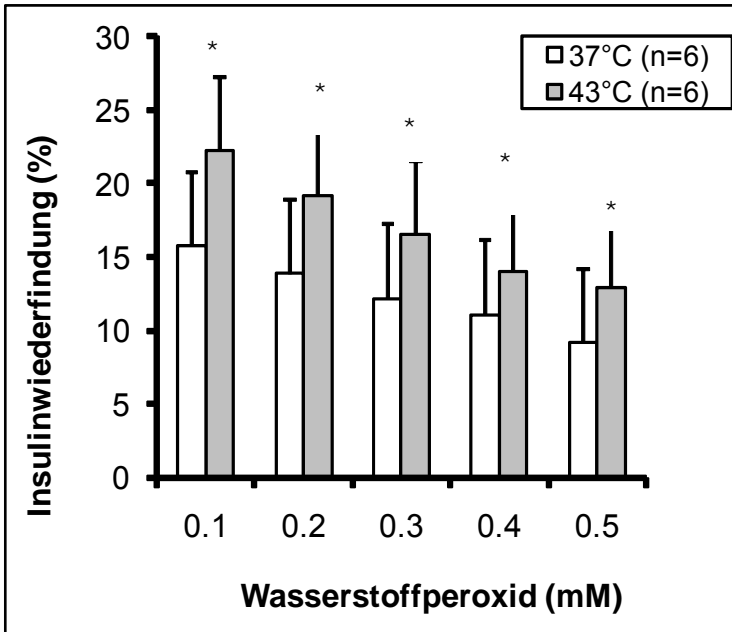


Abb.8 Wiedergewinnung von initial extrahiertem Insulin aus kontinuierlich bei 37°C (weiße Balken) bzw. hitzebehandelten (graue Balken) Schweineinseln nach 24stündiger Inkubation in H_2O_2 . * $P < 0.05$ für 37°C vs. 43°C.

Wie **Abb. 7** und **Abb. 8** verdeutlichen, war sowohl die Viabilität als auch die Insulinwiedergewinnung bei hypertherm vorbehandelten Inselzellen in allen

gewählten Wasserstoffperoxid-Konzentrationen signifikant höher als in der entsprechenden Kontrollgruppe.

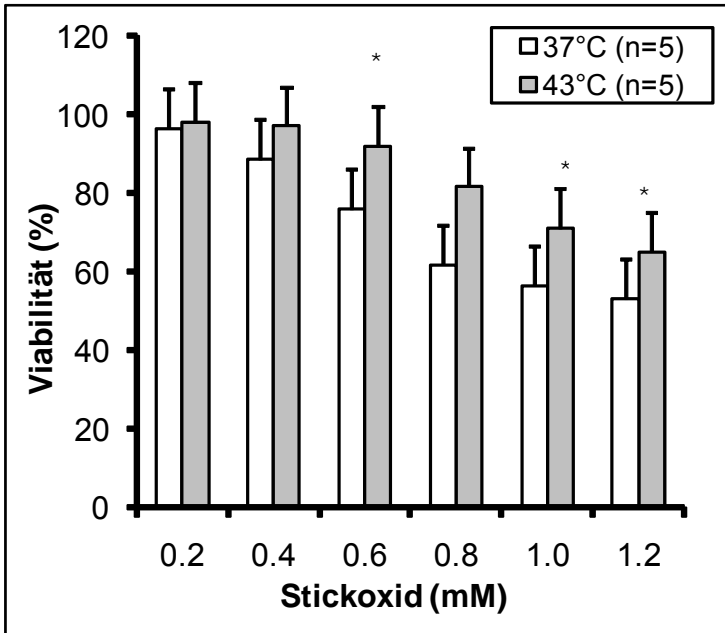


Abb.9 Trypanblauexklusion (%) von unbehandelten (weiße Balken) und hypertherm (graue Balken) vorbehandelten (hitzegeshockten) Inselzellen nach 24ständiger Inkubation in NO. Der relative Anteil von Trypanblau-negativen Zellen wurde auf die

korrespondierenden Werte von unbehandelten bzw. hitzegeschockten Inselzellen ohne Zusatz inflammatorischer Stimuli bezogen. * $P < 0.05$ für 37°C vs. 43°C.

Es zeigte sich eine kontinuierliche Verschlechterung der untersuchten Zellviabilität mit steigender Stickoxid-Konzentration. Der positive Effekt einer hyperthermen Vorbehandlung konnte bei allen untersuchten Wasserstoffperoxid-Konzentrationen beobachtet werden. Der Unterschied erreichte bei Konzentrationen ≥ 0.6 mM statistische Signifikanz (* $P < 0.05$ für 37°C vs. 43°C).

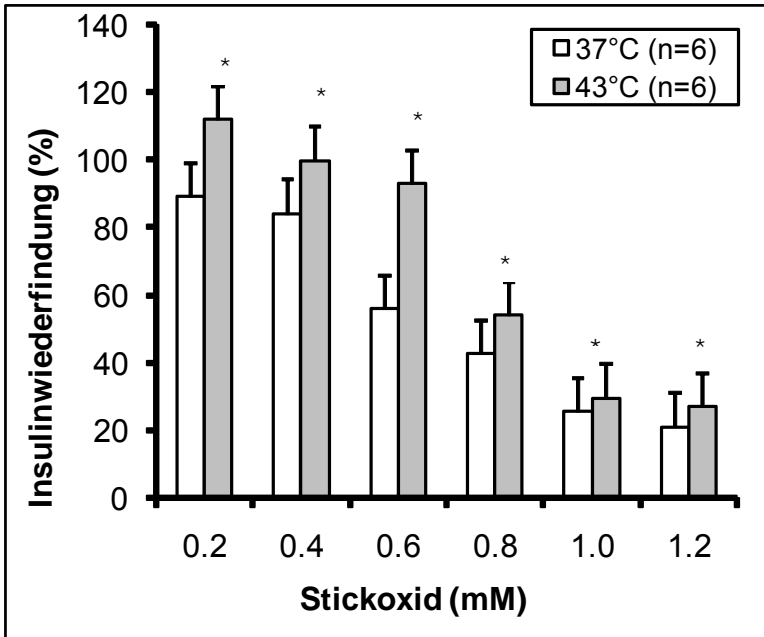


Abb.10 Wiedergewinnung von initial extrahiertem Insulin aus kontinuierlich bei 37°C (weiße Balken) bzw. hitzebehandelten (graue Balken) Schweineinseln nach 24stündiger Inkubation in NO. (*P<0.05 für 37°C vs. 43°C).

Wie **Abb. 9** und **Abb. 10** verdeutlichen, war sowohl die Viabilität als auch die Insulinwiedergewinnung bei hypertherm vorbehandelten Inselzellen in allen gewählten Stickoxid-Konzentrationen höher als in

der Kontrollgruppe. Während der Unterschied bei der Zellviabilität erst bei Stickoxid-Konzentrationen ≥ 0.6 mM signifikant wurde, erreichte die Insulinwiedergewinnung in der hitzebehandelten Gruppe bei allen gewählten Stickoxid-Konzentrationen statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe (* $P < 0.05$ für 37°C vs. 43°C).

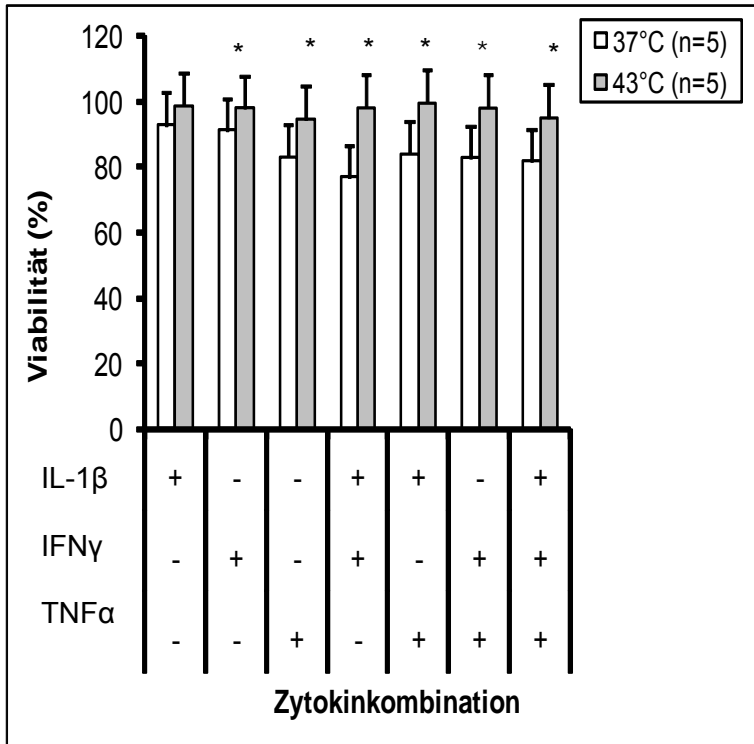


Abb.11 Trypanblauexklusion (%) von unbehandelten und hypertherm vorbehandelten (hitze geschockten) Inselzellen nach 48stündiger Inkubation in unterschiedlichen Zytokinkombinationen. Der relative Anteil von Trypanblau-negativen Zellen wurde auf die korrespondierenden Werte von unbehandelten (weiße Balken) bzw. hitze geschockten (graue

Balken) Inselzellen ohne Zusatz inflammatorischer Stimuli bezogen. * $P < 0.05$ für 37°C vs. 43°C.

Der positive Effekt einer hyperthermen Vorbehandlung auf die Inselzellviabilität im Vergleich zu unbehandelten Inselzellen zeigte sich in allen Behandlungsgruppen. Mit Ausnahme einer reinen IL-1 β -Exposition war der Unterschied zu den unbehandelten Inselzellen in allen anderen, möglichen Kombinationen statistisch signifikant (* $P < 0.05$ für 37°C vs. 43°C).

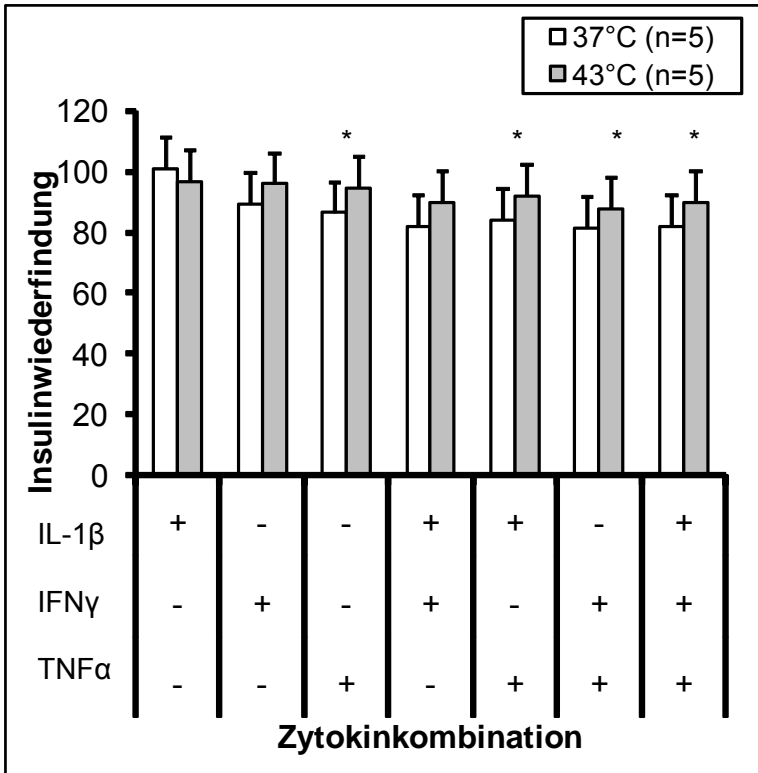


Abb.12 Wiedergewinnung von initial extrahiertem Insulin aus kontinuierlich bei 37°C (weiße Balken) bzw. hitzebehandelten (graue Balken) Schweineinseln nach 48stündiger Inkubation in unterschiedlichen Zytokinkombinationen. (*P<0.05, 37°C vs. 43°C).

Wie **Abb. 11** und **Abb. 12** verdeutlichen, war sowohl die Viabilität als auch die Insulinwiedergewinnung bei hypertherm vorbehandelten Inselzellen in allen gewählten Zytokinkombinationen, mit Ausnahme von IL-1 β allein, höher als in der Kontrollgruppe. Während der Unterschied bei der Zellviabilität lediglich bei der reinen IL-1 β -Inkubation keine statistische Signifikanz erreichte, erreichte der Unterschied bei der Insulinwiedergewinnung nur unter Beteiligung von TNF α als alleinige Noxe oder in Kombination mit IL-1 β bzw. IFN γ statistische Signifikanz (*P<0.05 für 37°C vs. 43°C).

3.4 Einfluss von DEVD-CMK und NAC auf die Expression pro- und antiapoptotischer Proteine nach hyperthermer Vorbehandlung

3.4.1 Effekt von DEVD-CMK

3.4.1.1 Effekt auf die pro- und antiapoptotischen Proteine Bax und Bcl-2

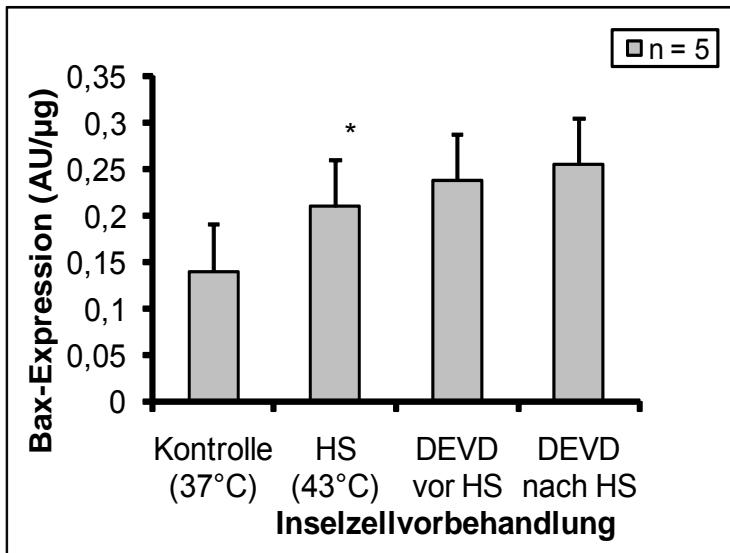


Abb. 13 Einfluss von hyperthermen Stress (HS) allein, sowie nach 4stündiger Inkubation mit DEVD vor bzw. nach Hyperthermie (43°C) auf den Anstieg von Bax. *P<0.05 für 37°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

Abb. 13 zeigt, dass die Expression von Bax nach Hyperthermie im Vergleich zu unbehandelten Inselzellen signifikant anstieg. Gleichzeitig wird deutlich, dass die Inkubation in DEVD-CMK, unabhängig vom Applikationszeitpunkt, keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Bax hat.

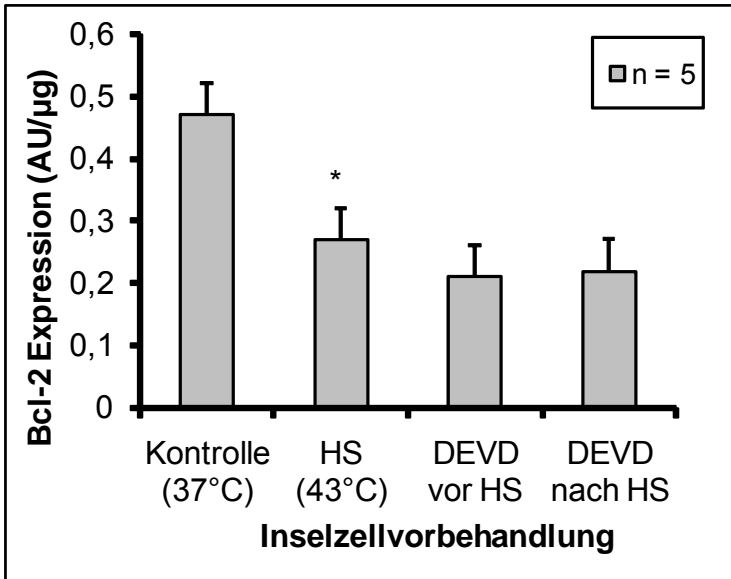


Abb. 14 Einfluss von hyperthermen Stress (HS) allein, sowie nach 4stündiger Inkubation mit DEVD vor bzw. nach Hyperthermie (43°C) auf die Bcl-2 Expression. * $P < 0.05$ für 37°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

Abb. 14 zeigt, dass die Expression von Bcl-2 nach Hyperthermie im Vergleich zu unbehandelten Inselzellen signifikant abfällt. Gleichzeitig wird

deutlich, dass die Inkubation in DEVD-CMK, unabhängig vom Applikationszeitpunkt, keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Bcl-2 hat.

Wie **Abb. 13** und **Abb. 14** verdeutlichen, war der Anstieg bzw. der Abfall der Bax- bzw. Bcl-2 Expression nach hyperthermer Behandlung der Inselzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant. Der Einsatz von DEVD-CMK hatte, unabhängig vom Applikationszeitpunkt, keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die untersuchte Proteinexpression im Vergleich zu den unbehandelten, hitzegeschockten Inselzellen.

3.4.1.2 Wirkung auf die Caspase-3 und DFF Expression

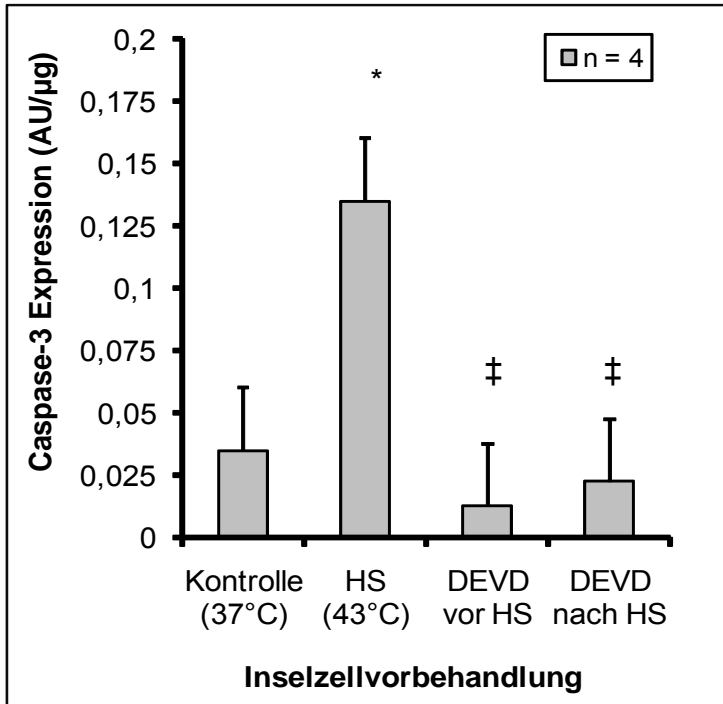


Abb.15 Einfluss von hyperthermen (HS) Stress allein, sowie nach 4stündiger Inkubation mit DEVD vor bzw. nach Hyperthermie (43°C) auf die Caspase-3 Expression. *P<0.05 für 37°C vs. 43°C

bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln;
‡P<0.05 für 43°C mit DEVD vor bzw. nach Hyperthermie vs. HS alleine.

Abb. 15 zeigt, dass die Expression von Caspase-3 nach Hyperthermie im Vergleich zu unbehandelten Inselzellen signifikant ansteigt. Gleichzeitig wird deutlich, dass die Inkubation in DEVD, unabhängig vom Applikationszeitpunkt, zu einer signifikant geringeren Expression von Caspase-3, im Vergleich zu hitzegeschockten Inselzellen ohne DEVD-Behandlung, führt.

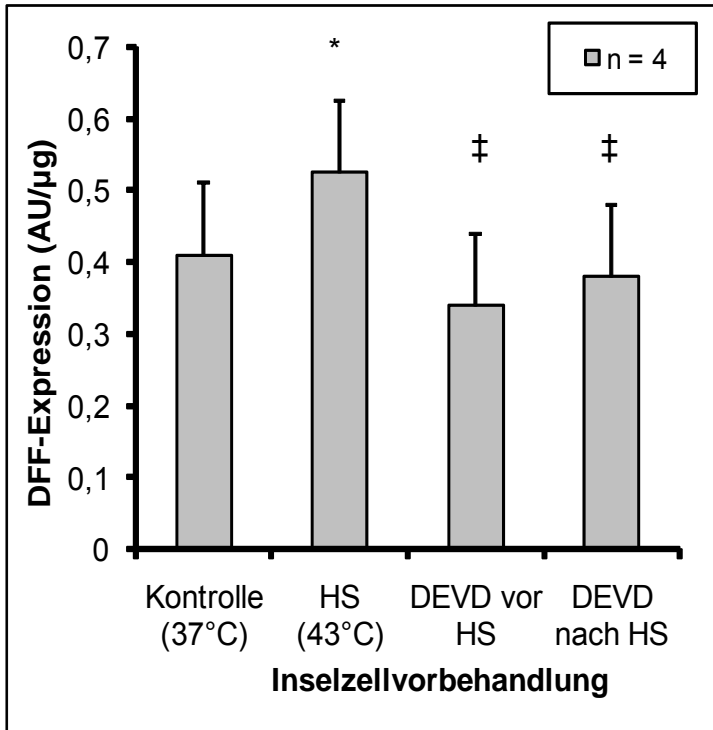


Abb.16 Einfluss von hyperthermen (HS) Stress allein, sowie nach 4stündiger Inkubation mit DEVD vor bzw. nach Hyperthermie (43°C) auf die DFF Expression.

* $P < 0.05$ für 37°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln;

$\dagger P < 0.05$ für 43°C mit DEVD vor bzw. nach
Hyperthermie vs. HS alleine.

Analog zu den Ergebnissen für Caspase-3 zeigt **Abb. 15**, dass die Expression von DFF nach Hyperthermie im Vergleich zu unbehandelten Inselzellen signifikant ansteigt. Gleichzeitig wird deutlich, dass die Inkubation in DEVD, unabhängig vom Applikationszeitpunkt, zu einer signifikant geringeren Expression von DFF, im Vergleich zu hitzegeschockten Inselzellen ohne DEVD-Inkubation, führt.

3.4.1.3 Wirkung auf die Expression der Hitzeschockproteine 27, 70 und 90

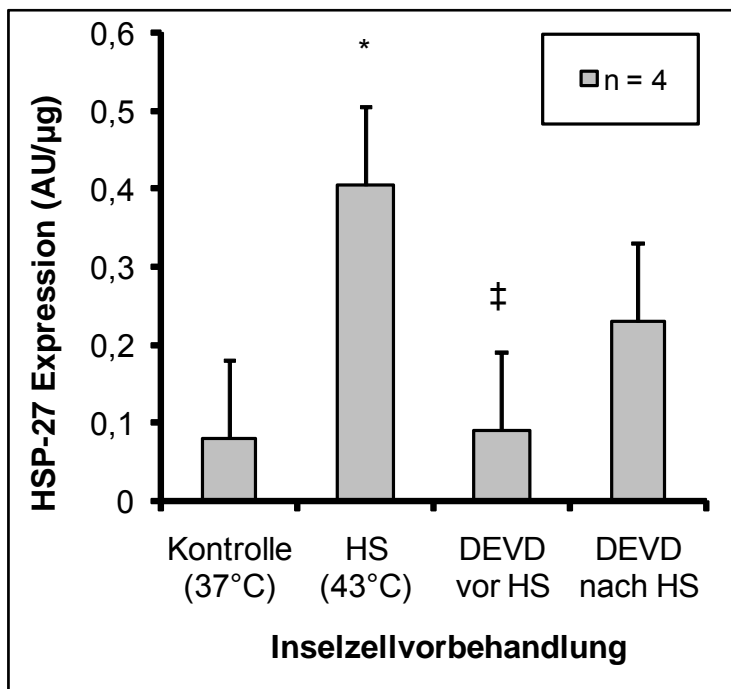


Abb. 17 Einfluss von hyperthermen (HS) Stress allein, sowie nach 4stündiger Behandlung mit DEVD vor bzw. nach Hyperthermie (43°C) auf die HSP-27 Expression.

* $P < 0.05$ für 37°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln;

‡ $P < 0.05$ für 43°C mit DEVD vor Hyperthermie HS alleine.

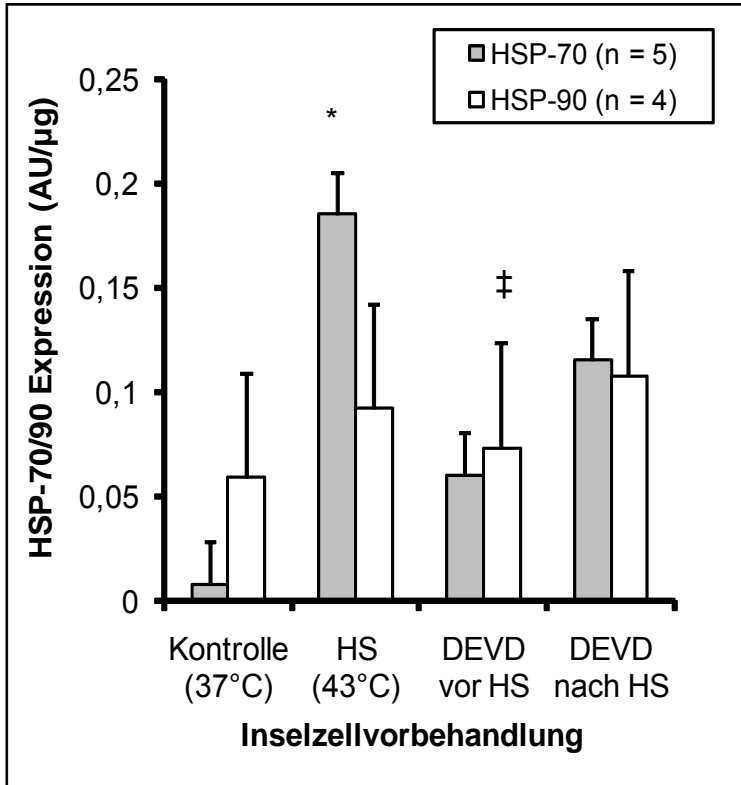


Abb.18 Einfluss von hyperthermen (HS) Stress allein, sowie nach 4stündiger Inkubation mit DEVD vor bzw. nach Hyperthermie (43°C) auf die HSP-70 (weiße Balken) und HSP-90 (graue Balken) Expression.

* $P < 0.05$ für 37°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln;

‡ $P < 0.05$ für 43°C mit DEVD vor Hyperthermie vs. HS alleine.

Wie Abb. 17 und Abb. 18 verdeutlichen, hatte der Zeitpunkt der Applikation des Apoptosehemmers DEVD-CMK einen signifikanten Einfluss auf die Expression der untersuchten Hitzeschockproteine. Bei Inkubation der Inselzellen in DEVD vor Hyperthermie war die Expression aller untersuchten Hitzeschockproteine signifikant geringer als nach hyperthermer Behandlung alleine.

3.4.2 Wirkungen von N-Acetyl-Cystein

3.4.2.1 Wirkung auf die pro- und antiapoptotisch wirksamen Proteine Bax und Bcl-2

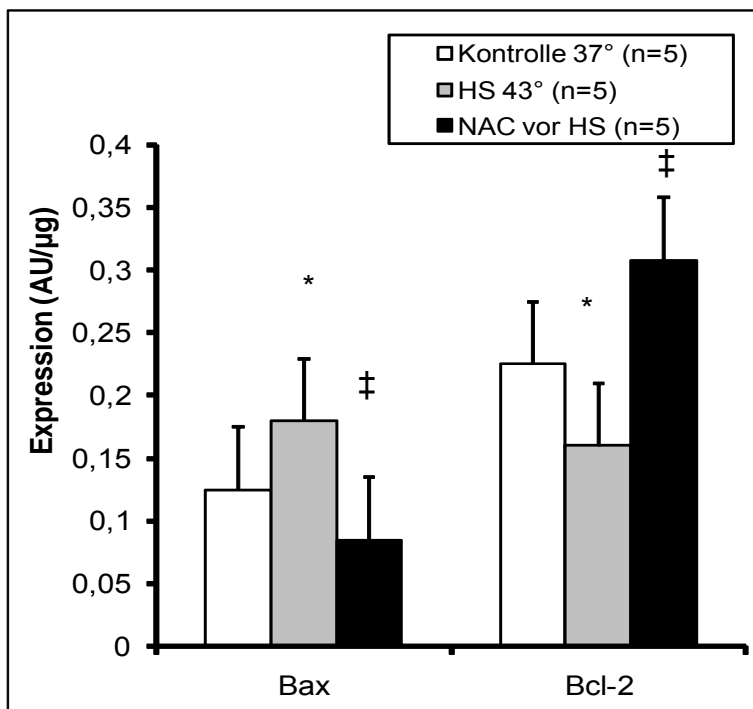


Abb.19 Einfluss von hyperthermen (HS) Stress allein (graue Balken), sowie nach initialer 4stündiger

Behandlung (schwarze Balken) mit NAC auf die Bax und Bcl-2 Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (weiße Balken).

* $P < 0.05$ für 37°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

[‡] $P < 0.05$ für HS + NAC vs. HS.

Abb. 19 zeigt in Korrelation zu **Abb. 13**, dass die steigende Expression von Bax nach Hyperthermie im Vergleich zu unbehandelten Inselzellen signifikant anstieg. Gleichzeitig wird deutlich, dass die vorhergehende Behandlung mit NAC einen signifikanten, reduzierenden Effekt auf die Expression von Bax hat. Die Expression von Bcl-2 verhält sich im Vergleich zur Bax-Expression gegenläufig. Zeigt sich nach Hyperthermie in Korrelation zu **Abb. 14** ein signifikanter Abfall der Bcl-2 Expression, so hat die Inkubation in NAC vor hyperthermen Stress einen signifikanten, positiven Einfluss auf die Expression von Bcl-2.

3.4.2.2 Wirkung auf die Caspase-3 und DFF Expression

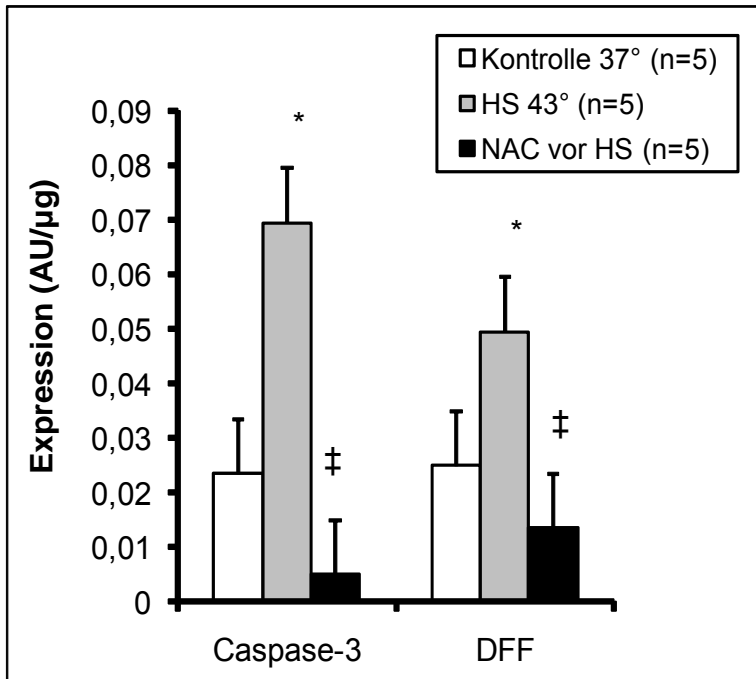


Abb.20 Einfluss von hyperthermen (HS) Stress allein (graue Balken), sowie nach initialer 4stündiger Behandlung (schwarze Balken) mit NAC vor HS auf die Caspase-3 und DFF Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (weiße Balken).

*P<0.05 für 37°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

‡P<0.05 für HS vs. HS + NAC.

Abb. 20 verdeutlicht, dass die Expression von Caspase-3 und DFF nach Hyperthermie im Vergleich zu unbehandelten Inselzellen signifikant anstieg. Gleichzeitig wird deutlich, dass eine initiale Behandlung mit NAC vor hyperthermen Stress einen signifikanten, negativen Einfluss auf die Expression der beiden Apoptose-Effektorproteine hat.

Abb. 19 und **Abb. 20** zeigen zusammenfassend einen signifikanten Einfluss von NAC auf die Expression der untersuchten pro- und antiapoptotischen Proteine. Dabei führte die Inkubation der Inselzellen in NAC zu einer signifikanten Mehrexpression von Bcl-2, während die Expression der proapoptotischen Proteine

signifikant geringer war im Vergleich zur alleinigen hyperthermen Vorbehandlung.

3.4.2.3 Wirkung auf die Expression der Hitzeschockproteine 27, 70 und 90

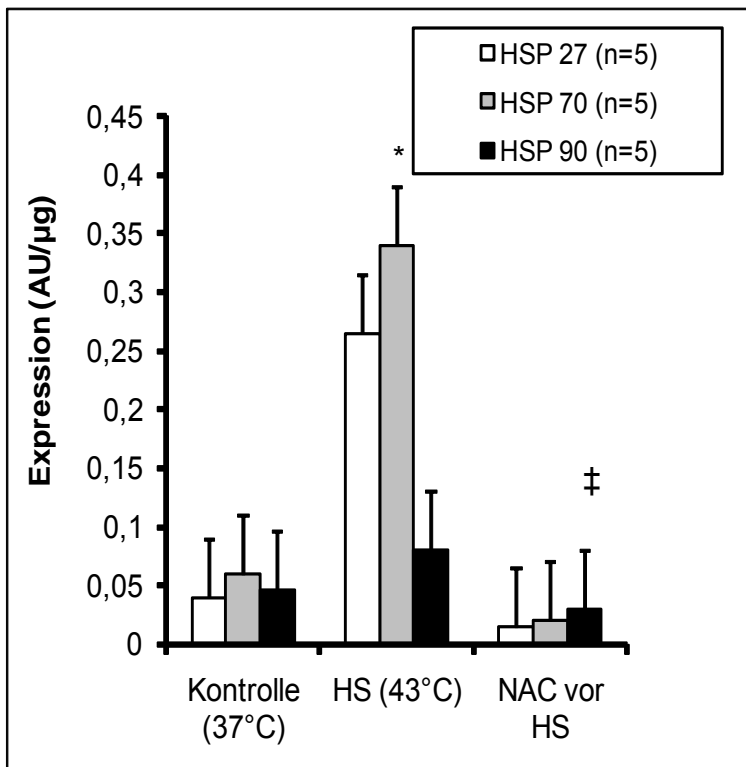


Abb.21 Einfluss von hyperthermen Stress allein, sowie nach initialer 4stündiger Behandlung mit NAC vor Hyperthermie (43°C) auf die HSP-27 (weiße Balken), -70 (graue Balken) und -90 (schwarze Balken) Expression.

* $P < 0.05$ für 37°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

‡ $P < 0.05$ für HS vs. HS + NAC vor Hyperthermie.

Abb. 21 zeigt, dass die Expression der untersuchten Hitzeschockproteine nach Hyperthermie im Vergleich zu unbehandelten Inselzellen signifikant anstieg. Gleichzeitig wird deutlich, dass die Inkubation in NAC vor hyperthermen Stress einen signifikanten, reduzierenden Effekt auf die Expression von HSP-27, -70 und -90 hat. Dies verdeutlicht den ambivalenten Charakter der NAC-Vorbehandlung auf die Expression der unterschiedlich wirksamen Proteine.

4. Diskussion

Objektiv ist das vorrangige Ziel der Transplantation des isolierten endokrinen Anteils des Pankreas die Wiederherstellung physiologischer Verhältnisse hinsichtlich der Homöostase des Glucosestoffwechsels. Das Erreichen dieser Vorgabe ist die wesentliche Voraussetzung, um Sekundärkomplikationen wie Nephro-, Neuro- und Retinopathie [9-11], die wesentlichen Einfluss auf Lebensqualität und –erwartung des Diabetikers haben, vorzubeugen. Für die betroffenen Patienten stehen subjektiv vor allem die Insulinunabhängigkeit [59, 60] und die damit verbundene Möglichkeit einer individuellen Gestaltung des Tagesablaufes im Vordergrund dieses therapeutischen Ansatzes.

Dem Ziel einer völligen Insulinunabhängigkeit stehen verschiedene Faktoren entgegen. So sind die Inselzellen vor und nach intraportaler Transplantation multiplen Stresssituationen ausgesetzt:

- Während der Organexplantation, der Inselzellisolierung, der Inselzellkultivierung sowie in den ersten Tagen nach Transplantation findet keine ausreichende Sauerstoffversorgung der Inselzellen statt [61]. Dies führt zur Einleitung apoptotischer Prozesse, die zum Untergang signifikanter Zellmengen führen. Zur Aufnahme ihrer endokrinen Tätigkeit stehen diese Zellen nicht mehr zur Verfügung.
- In der Leber ist das Transplantat dem proinflammatorischem Milieu der Leber sowie unspezifischen inflammatorischen Mediatoren wie Stickoxid und freien
- Radikalen ausgesetzt [41]. Wie die Hypoxie führt dies zu einem signifikanten Zelluntergang mit einer nachfolgenden Dysfunktion des Transplantates.

Um trotz dieser suboptimalen Verhältnisse vor und nach Transplantation das Therapieziel ‚Insulinunabhängigkeit‘ zu erreichen, müssen heutzutage in der Regel zwei oder mehr Spenderorgane für jeden Empfänger prozessiert werden [30]. Aufgrund der Knappheit von Spenderorganen wäre eine Optimierung der Zellausbeute pro Spenderorgan, sowie eine Erhöhung der Zellresistenz gegenüber subletalen Noxen mittels immunmodulatorischer Präkonditionierung wünschenswert.

Physiologischerweise reagieren Zellen auf subletalen Stress unter anderem mit der Synthese von Hitzeschockproteinen. Diese haben einen nachweislich protektiven Effekt gegenüber inflammatorischen Noxen [62-65], was sich im immunkompetenten Rattenmodell in einer höheren Resistenz gegenüber frühen inflammatorischen Noxen widerspiegelt [53].

Im Rahmen der experimentellen Transplantationsmedizin macht man sich die

protektiven Eigenschaften einer vermehrten Hitzeschockproteinsynthese zunutze:

Analog zu der Situation der Inselzelltransplantation, stehen in der Organtransplantation einer geringen Anzahl von Spendern viele potentielle Empfänger gegenüber. Zur optimalen Ausnutzung der vorhandenen Organressourcen wird nach Möglichkeiten gesucht sowohl die Organkonservierung nach Explantation als auch die Organfunktion nach Transplantation zu verbessern.

Im Rahmen der Nierentransplantation ist es vor allem die kalte Ischämiezeit nach Explantation, die abhängig von Empfängersuche, Organtransport sowie Empfängervorbereitung signifikante Zeitintervalle in Anspruch nehmen kann. Diese kalte Ischämie verursacht Schäden an Tubuli und Nierenmark mit einer konsekutiv verzögerten bzw. verminderten Transplantatfunktion [66, 67]. Aus diesem Grunde wäre eine erhöhte Toleranz der Spenderorgane gegenüber der kalten Ischämiezeit

wünschenswert. Redaelli et al. konnten zeigen, dass eine hypertherme Präkonditionierung von Lewis-Ratten zu einer signifikanten renalen Mehrexpression von HSP-72 führt. Die so präkonditionierten Nieren zeigten sowohl eine erhöhte Resistenz gegenüber prolongierten Ischämiezeiten als auch eine verbesserte Funktion nach Transplantation [68]. Ähnliche Ansätze wurden ebenfalls für die Transplantation von Leber und Herz im Rattenmodell beschrieben und zeigten viel versprechende Ergebnisse [69-71].

Abhängig von der einwirkenden Stressintensität reagieren die Zellen mit der Synthese unterschiedlicher Proteine, deren Identifikation eines der vorrangigen Ziele darstellt.

4.1 Auswirkungen moderater und starker Hyperthermie auf die Proteinexpression isolierter Inselzellen

Das verminderte Überleben von Inselzelltransplantaten nach erhöhter HSP

Expression, führt zu der Vermutung, dass starker Stress auch zu einer Co-Expression proapoptotischer Proteine wie Bax, Caspase-3, DFF und vor allem Fas und FasL führt.

Das Gleichgewicht zwischen proapoptotischen Bax und antiapoptotischen Bcl-2 sorgt für eine Stabilisierung der Mitochondrienmembran. Bei einem Ungleichgewicht zugunsten von Bax induziert freigesetztes Cytochrom C die Apoptosekaskade mit Hilfe von Caspasen. Die Caspasen werden in einer proteolytischen Reaktion aktiviert an deren Ende die Aktivierung von Caspase-3 als finalem Apoptose-Exekutor steht [72]. Über Spaltung des DANN-fragmentierenden Faktors (DFF) [73] wird die Fragmentierung der chromosomalen DNA initiiert.

Die Ligation zwischen Fas und FasLigand führt ebenso zu einer Initiierung der genannten proteolytischen Caspasekaskade. Fas Ligand wird entweder auf stimulierten zytotoxischen T-Zellen

oder auf Spenderinselzellen exprimiert. Wie in humanen Inselzellen gezeigt, kann eine Fas-Expression durch zellulären Stress in Form von Cytokinen [74, 75] und erhöhter Glukosekonzentrationen [76] hervorgerufen werden. Im Gegensatz zu humanen Inselzellen konnten wir bei isolierten porzinen Inselzellen eine konstitutive Expression von Fas feststellen. Ungeklärt blieb in diesem Zusammenhang, ob diese Beobachtung spezifisch für porcine Inselzellen ist, oder ob die basale Fas-Expression durch das Isolationsverfahren hervorgerufen wird [77].

Diese Beobachtungen verdeutlichen das ambivalente Verhalten der zellulären Antwort auf Stress. Offensichtlich werden sowohl Mechanismen zur Protektion als auch zur Selbstzerstörung simultan gestartet.

Ein weiteres Beispiel für die Dualität der Stressantwort von Zellen ist die induzierbare NO-Synthase (iNOS).

Aufgrund des modulatorischen Einflusses von NO mit seinen verschiedenen zytotoxischen und protektiven Funktionen, besitzt iNOS sowohl die Fähigkeit apoptotische Prozesse zu initiieren als auch zu hemmen [78]. In isolierten Inselzellen von Nagern und Menschen kann die Expression von iNOS durch Zytokinkombinationen induziert werden [79, 80].

In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass starke Hyperthermie ebenfalls zu einer Erhöhung der basalen iNOS-Expression führt. Obwohl sich die Steigerung der iNOS-Expression als statistisch nicht relevant erwies, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass unterschiedliche Arten von Stress über einen gemeinsamen Mechanismus wirken.

Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der HSP-Expression in Zellen eine Schutzfunktion gegenüber Apoptose ausüben kann [81, 82].

Die Divergenz zwischen den Resultaten verschiedener Arbeitsgruppen kann möglicherweise durch die Anwendung unterschiedlicher Protokolle zur hyperthermen Stressinduktion, bezüglich der Höhe der Temperatur und der Dauer der Behandlung, erklärt werden. Um diese Frage wenigstens teilweise zu erklären, wurden in der vorliegenden Untersuchung die Auswirkungen von moderaten und starken Stress auf Inselzellen untersucht.

Es zeigte sich, dass moderater Stress (41°C), mit Ausnahme von Bax, zwar zu einer geringeren Expression proapoptotischer Proteine in porzinen Inselzellen führte, jedoch auch keine maximale HSP-Expression erreicht werden konnte. Dagegen schien moderater Stress zu einer Erniedrigung der basalen Expression von porzinem Fas und FasLigand zu führen.

Die Veränderungen welche durch den geringen Unterschied zwischen moderatem (41°C±0,5°C)

und starkem ($43^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) hyperthermen Stress hervorgerufen werden, verdeutlichen eindrucksvoll den schmalen Grad zwischen Protektion und Selbstzerstörung [83].

Der initiale Trigger für die gesteigerte Hitzeschockprotein-Expression der Inselzellen nach hyperthermer Behandlung scheint dabei eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Radikale zu sein [84]. Ein intrazellulär prooxidativer Zustand wurde durch proapoptotische Mediatoren wie Cytokine [72, 73] und Arsen [85] infolge einer Freisetzung von Sauerstoffradikalen erreicht. Unsere Untersuchungen zeigen, dass die hypertherme Induktion von Hitzeschockproteinen durch den Einsatz effektiver Antioxidantien, wie N-Acetyl-Cystein, komplett inhibiert werden kann. Dies deutet an, dass Hyperthermie ebenfalls zu einer Sauerstoffradikalbildung in der Zelle führt.

Eine Erklärung für die Anfälligkeit isolierter Inselzellen gegenüber apoptotischen Mechanismen

könnte in ihrer, durch die fehlende Gewebematrix charakterisierten, artifiziellen Umgebung liegen. Diese bietet den Inselzellen nur unzureichende Bedingungen zur Aufrechterhaltung des Zellmetabolismus unter Stress [33, 77]. Zusätzlich weisen isolierte Inselzellen einen geringen Gehalt an antioxidativen Enzymsystemen als protektive Faktoren auf, was ihre Sensibilität gegenüber zytotoxischen Noxen fördert [85, 86].

4.2 Einfluss einer hyperthermen Präkonditionierung auf das Überleben von Inselzellen in einem inflammatorischen Milieu

Physiologischerweise besitzen Hitzeschockproteine grundlegende Aufgaben bei der Faltung, Translokation und Reparatur defekter Polypeptide. Nach Exposition gegenüber exogenen Noxen wird in allen Zellen eine Mehrexpression von Hitzeschockproteinen beobachtet, die der Wiederherstellung eines physiologischen zellulären Milieus dient. Diese ubiquitären Reaktionsmuster

verdeutlichen die wichtigen Aufgaben von Hitzeschockproteinen in der zellulären Protektion.

Takeda et al. zeigen [86], dass eine Überexpression von Hitzeschockproteinen in Inselzellen der Ratte deren Fähigkeit zur Insulinsekretion nach Glucosereiz, in Gegenwart von Stickoxid (NO), wiederherstellt. Nach Exposition unbehandelter Inselzellen gegenüber Interleukin-1 β , zeigt sich eine signifikant verminderte Insulinsekretion im Anschluss an einen Glucosereiz sowie eine signifikante Minderung des intrazellulären ATP-Gehalts im Vergleich zu Kontrollinselzellen. Die induzierte Überexpression von HSP-70 konnte sowohl die eingeschränkte Insulinsekretion als auch den intrazellulären ATP-Verlust verhindern. Die Autoren führen dies im Wesentlichen auf den Erhalt der Funktion des Enzyms Glukokinase zurück. Während in unbehandelten Inselzellen die Funktion der Glukokinase nach IL-1 β Exposition signifikant vermindert ist, zeigen vorbehandelte Inselzellen keine Beeinträchtigung. Als zusätzlicher protektiver

Mechanismus wird die marginale aber signifikante Verminderung intrazellulären NO induziert durch IL-1 β , beschrieben.

Die Inhibierung einer intrazellulär vermehrten NO-Synthese in Inselzellen der Ratte nach intraportaler Transplantation untersucht die Arbeitsgruppe von Brandhorst et al [47]. Sie evaluieren die Funktion von Inselzellen im T-Zell depletierten, diabetischen Kleintiermodell unter dem Einfluss selektiver und nicht-selektiver Inhibitoren der induzierbaren NO-Synthase im Vergleich zu unbehandelten sowie mit Kortikoiden behandelten Transplantatempfängern. Dabei zeigt sich eine signifikant verbesserte Transplantatfunktion unter Einsatz selektiver Inhibitoren der induzierbaren NO-Synthase im Vergleich zur unbehandelten Gruppe. Die im Vergleich zur kortikoidbehandelten Kontrollgruppe nicht-signifikanten Funktionsunterschiede, könnten zukünftig eine Verringerung inseltoxischer Steroide, unter Einsatz selektiver Inhibitoren der

induzierbaren NO-Synthase nach Transplantation möglich machen.

Grundlegende Ergebnisse der protektiven Eigenschaften von Hitzeschockproteinen lieferte die Arbeitsgruppe um Burkart et al [62]. Sie untersuchen den Einfluss einer selektiven Suppression der HSP 70 Expression in humanen Inselzellen auf das Überleben in Gegenwart von Stickoxid (NO). Es zeigt sich eine signifikante Verringerung der protektiven Fähigkeiten der Inselzellen verbunden mit einer statistisch signifikant erhöhten Zell-Nekroserate. Die Re-Induktion der HSP-70 Expression führt wieder zu einer normalen Resistenzlage der Inselzellen gegenüber NO. Grundlage dieser Ergebnisse scheint die bis zu 80% verringerte mitochondriale Aktivität der HSP-70 supprimierten Inselzellen zu sein. Diese Resultate verdeutlichen eindrucksvoll die Schlüsselrolle von Hitzeschockproteinen bei der Protektion von Inselzellen. Zu berücksichtigen sind allerdings die Spezies-spezifischen Differenzen der

Resistenz gegenüber inflammatorischen Mediatoren, die klar zwischen humanen und Nagerinseln aufgezogen wurden. Diese konnten ebenfalls auf das unterschiedliche Expressionsniveau von Hitzeschockproteinen zurückgeführt werden [87-89].

Anhand unserer Studien können wir bestätigen, dass die verstärkte Expression von Hitzeschockproteinen in isolierten, porzinen Inselzellen eine Schutzfunktion gegenüber hohen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Stickoxid (NO) und verschiedenen Zytokinkombinationen übernimmt. Im Gegensatz zu Befunden bei Inselzellen der Ratte und humanen Inselzellen, scheinen porcine Inselzellen natürlicherweise gegenüber hochdosiertem IL-1 β , zumindest während einer Kurzzeitinkubation von 48h, resistent zu sein.

4.3 Einfluss von DEVD-CMK und NAC auf die Expression pro- und antiapoptotischer Proteine nach hyperthermer Vorbehandlung

Wie oben beschrieben, werden durch Stresssituationen offensichtlich sowohl Mechanismen zur Protektion als auch zur Selbstzerstörung auf zellulärer Ebene simultan gestartet. Eine Schlüsselposition nehmen dabei Proteine der Bcl-2 Familie ein, die als pro- und antiapoptotische (z.B. Bcl-2, Bax u.a.) Gegenspieler die Induktion des mitochondrialen Apoptoseweges regulieren. Bcl-2, als antiapoptotischer Vertreter, zeigt dabei vielfältige Schutzfunktionen gegenüber exogenen Noxen wie Chemotherapeutika, Hitzeschock [90] oder TNF α [91, 92], und wirkt letztendlich einer Zellnekrose über die Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials entgegen [93].

Caspase-3 als apoptotisches Effektorprotein wirkt der antiapoptotischen Wirkung von Bcl-2 über

dessen Spaltung entgegen. Die vermehrte Expression von Caspase-3 in hypertherm präkonditionierten Inselzellen scheint damit auch wesentlicher Gegenspieler der protektiven Potenz von Hitzeschockproteinen zu sein. Durch eine gezielte Inhibierung der Caspase-3 konnten bereits in vivo viel versprechende Ergebnisse erzielt werden.

Nach Herztransplantation wird die vermehrte Produktion von zelltoxischen Zytokinen wie TNF α , begleitet von einer verminderten Expression von Bcl-2 beobachtet. Grünenfelder et al. [94] untersuchten den Einfluss einer Applikation des selektiven Caspase-3 Hemmers DEVD auf die Expression von Bcl-2 und TNF α nach allogener Herztransplantation im Rattenmodell. Im Vergleich zur Kontrollpopulation fand sich nach intraperitonealer Applikation von DEVD eine signifikante Mehrexpression von Bcl-2 begleitet von einer signifikanten Hemmung von TNF α . Die Autoren sehen hier die Möglichkeit, mittels einer

selektiven Hemmung der Caspase-3, transplantierte Organe gegen Reperfusionsschäden zu schützen.

Ähnliche Ergebnisse wurden von der Arbeitsgruppe Müller et al. veröffentlicht [95]. Sie untersuchten den Effekt einer selektiven Caspasehemmung auf die Funktion und das Überleben nach Lebertransplantation im Rattenmodell. Kontrollparameter waren Gallefluss, die mikroskopische Integrität der vaskulären Strombahn sowie das Überleben der Transplantatempfänger. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikante Verringerung der Apoptoserate endothelialer Zellen mit einer verbesserten Organperfusion, begleitet von einem erhöhten, intrazellulären Bcl-2 Level. Zusätzlich hatte die Applikation des Caspasehemmers einen positiven Einfluss auf das Überleben der Organempfänger. Schlussfolgernd wird der Einsatz von selektiven Caspasehemmern als viel versprechender Ansatz für den klinischen Einsatz beschrieben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Daten der genannten Studien. Die nach Hyperthermie beobachtete, signifikante Mehrexpression von Caspase-3 und DFF als Effektorproteine der Apoptose, kann durch den Einsatz von DEVD signifikant gehemmt werden. Dabei ist der Zeitpunkt der Behandlung mit DEVD unerheblich. Im Gegensatz dazu hat der Behandlungszeitpunkt von DEVD auf die gewünschte Mehrexpression der protektiven Hitzeschockproteine signifikanten Einfluss. Bei Einsatz vor Hyperthermie ist die Expression aller untersuchten Hitzeschockproteine signifikant geringer als nach Hyperthermie, während DEVD nach Hyperthermie keinen Einfluss auf die HSP-Expression hat. Um die positiven Effekte des Caspasehemmers zu nutzen sollten demnach isolierte Inselzellen vor der Inkubation in DEVD hypertherm präkonditioniert werden. Auf das Expressionsverhältnis Bax/Bcl2 hat DEVD, unabhängig vom Applikationszeitpunkt, keinen Einfluss.

Als zusätzliche Option einer antioxidativen Behandlung steht N-acetyl-L-cysteine (NAC) zur Verfügung. Junn et al. [96] beschreiben eine Hemmung der Dopamininduzierten Aktivierung von Caspase-3 und Caspase-9 im Zentralnervensystem, als Initiator der Apoptose, durch NAC. Unsere Ergebnisse demonstrieren den ambivalenten Charakter einer Inkubation isolierter Inselzellen in NAC vor Hyperthermie. Es zeigt sich zwar eine signifikante Hemmung der Expression proapoptotischer Proteine zugunsten der antiapoptotisch wirksamen Gegenspieler. Protektive Hitzeschockproteine werden dabei allerdings so stark reduziert, dass ihr Niveau unter dem unbehandelter Kontrollinseln (37°) lag. Dies lässt vermuten, dass zumindest im Modell der hypertherm vermittelten Hitzeschockprotein-Expression Radikale (Sauerstoffradikale) an der Induktion von Hitzeschockproteinen beteiligt sind.

Insgesamt wird deutlich, dass die Behandlung mit Apoptosehemmern einen signifikanten Einfluss auf die verschiedenen Proteinexpressionen besitzt. Welche Kombinationsmöglichkeiten in vivo erfolgreich sein könnten, bedarf einer weiteren Evaluierung.

5. Zusammenfassung

1. Die Möglichkeit einer langfristigen Insulinunabhängigkeit von Typ 1 Diabetikern nach Inselzelltransplantation wird durch das proinflammatorische Milieu der Leber als Implantationsort limitiert, und macht die Transplantation einer ausreichend großen Inselmenge notwendig.
2. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression von pro- und antiapoptotischen Proteinen nach Hyperthermie, deren Fähigkeit einer Resistenzerhöhung im inflammatorischen Milieu sowie die modulatorischen Fähigkeiten von selektiven Caspaseinhibitoren zu evaluieren.
3. Eine hypertherme Präkonditionierung führt neben einer Mehrexpression von protektiv wirksamen Hitzeschockproteinen zu einer signifikanten Mehrexpression

proapoptotischer Proteine, was die duale Antwort von Zellen auf subletale Stresssituationen eindrucksvoll verdeutlicht.

4. Hitzeschockproteine sind an der erhöhten Resistenz von Inselzellen gegenüber Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Stickoxid (NO) und verschiedenen Zytokinkombinationen beteiligt.
5. Der selektive Caspase-3 Hemmer Ac-DEVD-CMK hat in vitro einen signifikant hemmenden Einfluss auf die Expression der apoptotischen Effektorproteine Caspase-3 und DFF. Gleichzeitig beeinflusst er, angewandt nach hyperthermer Vorbehandlung, die erwünschte Überexpression von Hitzeschockproteinen nicht.
6. NAC als Antioxidans besitzt neben antiapoptotischen Eigenschaften, die über

eine signifikante Hemmung der Expression proapoptotischer Proteine charakterisiert ist, auch einen negativen Einfluss auf die Expression der protektiv wirksamen Hitzeschockprotein-Expression.

6. Summary

1. The possibility to reach long-term insulin independence of patients with type I diabetes by means of intraportal islet transplantation is limited due to the proinflammatory environment of the liver. This condition requires transplanting a numerous quantity of islet cells.
2. The goal of this work was to evaluate the expression of pro- and antiapoptotic proteins induced by hyperthermia, their ability to enhance resistance in an inflammatory environment as well as the modulatory abilities of selective-inhibitors.
3. Hyperthermic preconditioning of islet cells enhances the overexpression of protective heat shock proteins as well as proapoptotic proteins demonstrating the binary answer of cells on sublethal stress situations.

4. Heat shock proteins are involved in the increased resistance of islet cells exposed to hydrogen peroxide, nitrogen oxide and various combinations of cytokines.
5. The selective caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-CMK reduces significantly the expression of the apoptotic proteins caspase-3 and DFF. At the same time, the overexpression of heat shock proteins is not affected if applied after hyperthermic preconditioning.
6. Besides an antioxidative effect by inhibiting the expression of proapoptotic proteins, NAC seems to have a negative influence on the synthesis of protective heat shock proteins.

7. Referenzen

1. Bretzel, R.G., in Giessener Universitätsblätter, 2001/02.
2. Joner, G. and O. Sovik, Increasing incidence of diabetes mellitus in Norwegian children 0-14 years of age 1973-1982. Diabetologia, 1989. 32(2): p. 79-83.
3. Dorman, J.S., et al., Worldwide differences in the incidence of type I diabetes are associated with amino acid variation at position 57 of the HLA-DQ beta chain. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(19): p. 7370-4.
4. Dorman, J.S. and R.E. LaPorte, IDDM epidemiology. Next generation of research. Diabetes Care, 1990. 13(2): p. 184-5.
5. Gillespie, K.M., E.A. Gale, and P.J. Bingley, High familial risk and genetic susceptibility in early onset childhood diabetes. Diabetes, 2002. 51(1): p. 210-4.

6. Banting, F.G. and C.H. Best, Pancreatic extracts. 1922. J Lab Clin Med, 1990. 115(2): p. 254-72.
7. DeWitt, D.E. and I.B. Hirsch, Outpatient insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus: scientific review. Jama, 2003. 289(17): p. 2254-64.
8. Grimaldi, A. and A. Heurtier, [Epidemiology of cardio-vascular complications of diabetes]. Diabetes Metab, 1999. 25 Suppl 3: p. 12-20.
9. Bodanowitz, S. and P. Kroll, [Early diagnosis and therapy of diabetic retinopathy]. Ther Umsch, 1996. 53(12): p. 934-42.
10. Bretzel, R.G., Pathogenese und Therapie des Diabetes mellitus. Med. Welt, 1985: p. p. 36: 927.
11. Hasslacher, C., et al., Similar risks of nephropathy in patients with type I or type II diabetes mellitus. Nephrol Dial Transplant, 1989. 4(10): p. 859-63.

12. Bretzel, R.G., Hering BJ, Federlin KF, Islet transplantation registry report 1991. *Diab Nutr Metab*, 1992. 5 suppl: p. 177 - 181.
13. Morel, P., et al., Long-term glucose control in patients with pancreatic transplants. *Ann Intern Med*, 1991. 115(9): p. 694-9.
14. Kelly, W.D., et al., Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery*, 1967. 61(6): p. 827-37.
15. Robertson, R.P., et al., Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. *Diabetes Care*, 2000. 23(1): p. 112-6.
16. Bolinder, J., et al., Improved glucose counterregulation after pancreas transplantation in diabetic patients with unawareness of hypoglycemia. *Transplant Proc*, 1991. 23(1 Pt 2): p. 1667-9.
17. Navarro, X., et al., Neuropathy and mortality in diabetes: influence of pancreas transplantation. *Muscle Nerve*, 1996. 19(8): p. 1009-16.

18. Tyden, G., J. Tollemar, and J. Bolinder, Combined pancreas and kidney transplantation improves survival in patients with end-stage diabetic nephropathy. Clin Transplant, 2000. 14(5): p. 505-8.
19. Tyden, G., et al., Improved survival in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and end-stage diabetic nephropathy 10 years after combined pancreas and kidney transplantation. Transplantation, 1999. 67(5): p. 645-8.
20. Wilczek, H.E., et al., Evolution of diabetic nephropathy in kidney grafts. Evidence that a simultaneously transplanted pancreas exerts a protective effect. Transplantation, 1995. 59(1): p. 51-7.
21. Fioretto, P., et al., Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. N Engl J Med, 1998. 339(2): p. 69-75.
22. Nakache, R., G. Tyden, and C.G. Groth, Long-term quality of life in diabetic patients

- after combined pancreas-kidney transplantation or kidney transplantation. Transplant Proc, 1994. 26(2): p. 510-1.
23. Drognitz, O. and U.T. Hopt, [Pancreas transplantation: a survey on indications, surgical techniques, immunosuppression, complications and outcome]. Zentralbl Chir, 2003. 128(10): p. 821-30.
 24. Hopt, U.T. and O. Drognitz, Pancreas organ transplantation. Short and long-term results in terms of diabetes control. Langenbecks Arch Surg, 2000. 385(6): p. 379-89.
 25. Becker, B.N., et al., Simultaneous pancreas-kidney and pancreas transplantation. Minerva Urol Nefrol, 2002. 54(4): p. 213-26.
 26. Al-Shurafa, H.A., et al., Innovations in pancreas transplantation. Saudi Med J, 2002. 23(3): p. 265-71.
 27. Mohan, P., et al., Improved patient survival in recipients of simultaneous pancreas-kidney transplant compared with kidney transplant alone in patients with type 1 diabetes mellitus

- and end-stage renal disease. *Br J Surg*, 2003. 90(9): p. 1137-41.
28. Gruessner, R.W., et al., The surgical risk of pancreas transplantation in the cyclosporine era: an overview. *J Am Coll Surg*, 1997. 185(2): p. 128-44.
 29. Woehrle, M., et al., The influence of the culture temperature on insulin release, antigen expression and allograft survival of islets of Langerhans. *Horm Metab Res Suppl*, 1990. 25: p. 96-100.
 30. Shapiro, A.M., et al., Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*, 2000. 343(4): p. 230-8.
 31. Ryan, E.A., et al., Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes*, 2001. 50(4): p. 710-9.
 32. Contreras, J.L., et al., Brain death significantly reduces isolated pancreatic islet

- yields and functionality in vitro and in vivo after transplantation in rats. *Diabetes*, 2003. 52(12): p. 2935-42.
33. Vajkoczy, P., et al., Angiogenesis and vascularization of murine pancreatic islet isografts. *Transplantation*, 1995. 60(2): p. 123-7.
 34. Lakey, J.R., et al., Variables in organ donors that affect the recovery of human islets of Langerhans. *Transplantation*, 1996. 61(7): p. 1047-53.
 35. Lakey, J.R., et al., Effect of core pancreas temperature during cadaveric procurement on human islet isolation and functional viability. *Transplantation*, 2002. 73(7): p. 1106-10.
 36. Vargas, F., et al., Endotoxin contamination may be responsible for the unexplained failure of human pancreatic islet transplantation. *Transplantation*, 1998. 65(5): p. 722-7.

37. Thomas, F., et al., An improved technique for isolating pig islets: the importance of tensegrity in islet long-term culture viability. *Transplant Proc*, 1999. 31(1-2): p. 633-4.
38. Eckhardt, T., et al., Endotoxin impairs the engraftment of rat islets transplanted beneath the kidney capsule of C57BL/6-mice. *J Mol Med*, 1999. 77(1): p. 123-5.
39. Jahr, H., S. Kiowski, and R. von Baehr, [Activation of human granulocytes and monocytes by physiologic concentrations of thiocyanate (rhodanide)]. *Allerg Immunol (Leipz)*, 1986. 32(4): p. 271-5.
40. Paraskevas, S., et al., Apoptosis occurs in freshly isolated human islets under standard culture conditions. *Transplant Proc*, 1997. 29(1-2): p. 750-2.
41. Bottino, R., et al., Transplantation of allogeneic islets of Langerhans in the rat liver: effects of macrophage depletion on graft survival and microenvironment activation. *Diabetes*, 1998. 47(3): p. 316-23.

42. Stevens, R.B., et al., Role of nitric oxide in the pathogenesis of early pancreatic islet dysfunction during rat and human intraportal islet transplantation. *Transplant Proc*, 1994. 26(2): p. 692.
43. Wu, G., et al., Pig islet xenograft rejection is markedly delayed in macrophage-depleted mice: a study in streptozotocin diabetic animals. *Xenotransplantation*, 2000. 7(3): p. 214-20.
44. Goto, M., et al., Low molecular weight dextran sulfate prevents the instant blood-mediated inflammatory reaction induced by adult porcine islets. *Transplantation*, 2004. 77(5): p. 741-7.
45. Goto, M., et al., Low-molecular weight dextran sulfate abrogates the instant blood-mediated inflammatory reaction induced by adult porcine islets both in vitro and in vivo. *Transplant Proc*, 2004. 36(4): p. 1186-7.
46. El-Ouaghli, A., et al., Cytokine mRNA expression in peripheral blood cells of

- immunosuppressed human islet transplant recipients. *J Mol Med*, 1999. 77(1): p. 115-7.
47. Brandhorst, D., et al., Prevention of early islet graft failure by selective inducible nitric oxide synthase inhibitors after pig to nude rat intraportal islet transplantation. *Transplantation*, 2001. 71(2): p. 179-84.
 48. Welch, W.J., et al., Response of mammalian cells to metabolic stress; changes in cell physiology and structure/function of stress proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1991. 167: p. 31-55.
 49. Maataoui A. Evaluierung des Einflusses von Stressproteinen auf das frühe Überleben sowie die Funktion transplanterter Inselzellen des Schweins und Menschen im Kleintiermodell. 2006.
 50. Bellmann, K., et al., Heat shock induces resistance in rat pancreatic islet cells against nitric oxide, oxygen radicals and streptozotocin toxicity in vitro. *J Clin Invest*, 1995. 95(6): p. 2840-5.

51. Bellmann, K., et al., Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett*, 1996. 391(1-2): p. 185-8.
52. Brandhorst, D., et al., Pretransplant induction of HSP-70 in isolated adult pig islets decreases early islet xenograft survival. *Cell Transplant*, 2000. 9(3): p. 423-30.
53. Brandhorst, D., et al., Hyperthermic preconditioning protects pig islet grafts from early inflammation but enhances rejection in immunocompetent mice. *Cell Transplant*, 2003. 12(8): p. 859-65.
54. Brandhorst, D., et al., High-dosed nicotinamide decreases early graft failure after pig to nude rat intraportal islet transplantation. *Transplantation*, 2002. 73(1): p. 74-9.
55. Heller, B., et al., Analysis of oxygen radical toxicity in pancreatic islets at the single cell level. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1994. 375(9): p. 597-602.

56. Brandhorst, D., et al., Islet isolation from the pancreas of large mammals and humans: 10 years of experience. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1995. 103 Suppl 2: p. 3-14.
57. Brandhorst, D., et al., Influence of donor data and organ procurement on human islet isolation. *Transplant Proc*, 1994. 26(2): p. 592-3.
58. Ricordi, C., et al., Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetol Lat*, 1990. 27(3): p. 185-95.
59. Socci, C., et al., Fresh human islet transplantation to replace pancreatic endocrine function in type 1 diabetic patients. Report of six cases. *Acta Diabetol*, 1991. 28(2): p. 151-7.
60. Warnock, G.L., et al., Normoglycaemia after transplantation of freshly isolated and cryopreserved pancreatic islets in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1991. 34(1): p. 55-8.

61. Linn, T., et al., Angiogenic capacity of endothelial cells in islets of Langerhans. *Faseb J*, 2003. 17(8): p. 881-3.
62. Burkart, V., et al., Natural resistance of human beta cells toward nitric oxide is mediated by heat shock protein 70. *J Biol Chem*, 2000. 275(26): p. 19521-8.
63. Wachlin, G., et al., Stress response of pancreatic islets from diabetes prone BB rats of different age. *Autoimmunity*, 2002. 35(6): p. 389-95.
64. Rothe, H. and H. Kolb, Strategies of protection from nitric oxide toxicity in islet inflammation. *J Mol Med*, 1999. 77(1): p. 40-4.
65. Langer, T. and W. Neupert, Heat shock proteins hsp60 and hsp70: their roles in folding, assembly and membrane translocation of proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1991. 167: p. 3-30.
66. Hauet, T., et al., Influence of retrieval conditions on renal medulla injury: evaluation

- by proton NMR spectroscopy in an isolated perfused pig kidney model. *J Surg Res*, 2000. 93(1): p. 1-8.
67. Donnahoo, K.K., et al., Early kidney TNF- α expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*, 1999. 277(3 Pt 2): p. R922-9.
68. Redaelli, C.A., et al., Hyperthermia preconditioning induces renal heat shock protein expression, improves cold ischemia tolerance, kidney graft function and survival in rats. *Nephron*, 2002. 90(4): p. 489-97.
69. Kevelaitis, E., et al., Backtable heat-enhanced preconditioning: a simple and effective means of improving function of heart transplants. *Ann Thorac Surg*, 2001. 72(1): p. 107-12; discussion 112-3.
70. Shimabukuro, T., et al., Induction of heat shock response: effect on the rat liver with carbon tetrachloride-induced fibrosis from

- ischemia-reperfusion injury. *World J Surg*, 1998. 22(5): p. 464-8; discussion 468-9.
71. Matsumoto, K., K. Honda, and N. Kobayashi, Protective effect of heat preconditioning of rat liver graft resulting in improved transplant survival. *Transplantation*, 2001. 71(7): p. 862-8.
 72. Yamada, K., et al., Essential role of caspase-3 in apoptosis of mouse beta-cells transfected with human Fas. *Diabetes*, 1999. 48(3): p. 478-83.
 73. Liu, X., et al., DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 1997. 89(2): p. 175-84.
 74. Loweth, A.C., et al., Human islets of Langerhans express Fas ligand and undergo apoptosis in response to interleukin-1 β and Fas ligation. *Diabetes*, 1998. 47(5): p. 727-32.
 75. Stassi, G., et al., Nitric oxide primes pancreatic beta cells for Fas-mediated

- destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med*, 1997. 186(8): p. 1193-200.
76. Maedler, K., et al., Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes*, 2001. 50(8): p. 1683-90.
 77. Rosenberg, L., et al., Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death. *Surgery*, 1999. 126(2): p. 393-8.
 78. Brune, B., A. von Knethen, and K.B. Sandau, Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol*, 1998. 351(3): p. 261-72.
 79. Delaney, C.A., et al., Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. *Endocrinology*, 1997. 138(6): p. 2610-4.
 80. Rabinovitch, A., et al., Cytotoxic effects of cytokines on rat islets: evidence for involvement of free radicals and lipid

- peroxidation. *Diabetologia*, 1992. 35(5): p. 409-13.
81. Samali, A. and T.G. Cotter, Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp Cell Res*, 1996. 223(1): p. 163-70.
 82. Mehlen, P., K. Schulze-Osthoff, and A.P. Arrigo, Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem*, 1996. 271(28): p. 16510-4.
 83. Boreham, D.R., et al., Heat-induced thermal tolerance and radiation resistance to apoptosis in human lymphocytes. *Biochem Cell Biol*, 1997. 75(4): p. 393-7.
 84. Gorman, A.M., et al., Antioxidant-mediated inhibition of the heat shock response leads to apoptosis. *FEBS Lett*, 1999. 445(1): p. 98-102.
 85. Chen, Y.C., S.Y. Lin-Shiau, and J.K. Lin, Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced

- apoptosis. *J Cell Physiol*, 1998. 177(2): p. 324-33.
86. Takeda, T., et al., Heat shock restores insulin secretion after injury by nitric oxide by maintaining glucokinase activity in rat islets. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 284(1): p. 20-5.
 87. Brandhorst, D., et al., ATP content of isolated islets: indication for species-dependent vulnerability for cell-mediated graft rejection? *Transplant Proc*, 1997. 29(4): p. 2058.
 88. Wacker, T., et al., Different toxic effects of hydrogen peroxide, nitric oxide, and superoxide on human, pig, and rat islets of Langerhans. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1995. 103 Suppl 2: p. 133-35.
 89. Eizirik, D.L., Beta-cell defence and repair mechanisms in human pancreatic islets. *Horm Metab Res*, 1996. 28(6): p. 302-5.
 90. Korsmeyer, S.J., Bcl-2: an antidote to programmed cell death. *Cancer Surv*, 1992. 15: p. 105-18.

91. Jaattela, M., et al., Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells. *Oncogene*, 1995. 10(12): p. 2297-305.
92. Haendeler, J., et al., Endotoxic shock leads to apoptosis in vivo and reduces Bcl-2. *Shock*, 1996. 6(6): p. 405-9.
93. Shimizu, S., et al., Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by Bcl-2 and ICE inhibitors: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transductions. *Oncogene*, 1996. 12(10): p. 2045-50.
94. Grunenfelder, J., et al., Upregulation of Bcl-2 through caspase-3 inhibition ameliorates ischemia/reperfusion injury in rat cardiac allografts. *Circulation*, 2001. 104(12 Suppl 1): p. I202-6.
95. Mueller, T.H., et al., Caspase 3 inhibition improves survival and reduces early graft injury after ischemia and reperfusion in rat

liver transplantation. Transplantation, 2004. 78(9): p. 1267-73.

96. Junn, E. and M.M. Mouradian, Apoptotic signaling in dopamine-induced cell death: the role of oxidative stress, p38 mitogen-activated protein kinase, cytochrome c and caspases. J Neurochem, 2001. 78(2): p. 374-83.

8. Anhang

8.1 Abkürzungen

Abb	Abbildung
athym	athymisch
d	Tage
diab	diabetisch
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EIA	Enzymimmunoassay
g	Gramm
h	Stunde
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HSP	Hitzeschockprotein
IDDM	insulin dependant diabetes mellitus
IEQ	Inseläquivalente
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickoxyd Synthase
IRI	immunreaktives Insulin
Kap	Kapitel
kD	kilo Dalton (Einheit des Molekulargewichts)
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
m	Milli
M	Mol
μ	Mikro
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl

NA	Nikotinamid
NO	Stickoxyd
Op	Operation
RIA	Radio Immuno Assay
sec	Sekunde
U	unit
STZ	Streptozotocin
Tab	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TX	Transplantation
vs	versus

8.2 Tabellen

Tab.1	Unterscheidung früher und später Apoptosestadien mittels Doppelfärbung mit Annexin V und PI
-------	---

8.3 Abbildungen

Abb.1 Einfluss von hyperthermen Stress auf den relativen Anstieg von HSP-27, -70 und -90 in Schweineinseln nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken). *P<0.05 für 41°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

Abb.2 Frühe Apoptose (in %) scheinbehandelter (grauer Balken) bzw. hypertherm (43°C) vorbehandelter (gestreifter Balken) Inselzellen nach Übernachtkultur. Als Kontrolle diente die Apoptoserate frisch isolierter Inselzellen (weißer Balken). *P<0.05 für 37°C bzw. 43°C vs. frisch isolierte Inselzellen).

Abb. 3 Einfluss von hyperthermen Stress auf den relativen Anstieg von Bax und Bcl-2 in Schweineinseln nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken). *P<0.05 für 41°C vs. 43°C bezogen auf die

jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

Abb.4 Einfluss von hyperthermen Stress auf das Bax/Bcl-2 Verhältnis nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken). *P<0.05 für 41°C vs. 43°C.

Abb. 5 Einfluss von hyperthermen Stress auf den relativen Anstieg von Fas, FasL und iNOS in Schweineinseln nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken). *P<0.05 für 41°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

Abb.6 Einfluss von hyperthermen Stress auf den Anstieg der Caspase-3 Aktivität und Expression von DFF in Schweineinseln nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken). *P<0.05 für 41°C vs. 43°C bezogen

auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

Abb.7 Trypanblauexklusion (%) von unbehandelten (weiße Balken) und hypertherm (graue Balken) vorbehandelten (hitzegechockten) Inselzellen nach 24stündiger Inkubation in H₂O₂. Der relative Anteil von Trypanblau-negativen Zellen wurde auf die korrespondierenden Werte von unbehandelten bzw. hitzegechockten Inselzellen ohne Zusatz inflammatorischer Stimuli bezogen. *P<0.05 für 37°C vs. 43°C.

Abb.8 Wiedergewinnung von initial extrahiertem Insulin aus kontinuierlich bei 37°C (weiße Balken) bzw. hitzebehandelten (graue Balken) Schweineinseln nach 24stündiger Inkubation in H₂O₂. *P<0.05 für 37°C vs. 43°C.

Abb.9 Trypanblauexklusion (%) von unbehandelten (weiße Balken) und hypertherm (graue Balken) vorbehandelten (hitzegechockten) Inselzellen nach 24stündiger Inkubation in NO. Der relative Anteil

von Trypanblau-negativen Zellen wurde auf die korrespondierenden Werte von unbehandelten bzw. hitzegeschockten Inselzellen ohne Zusatz inflammatorischer Stimuli bezogen. *P<0.05 für 37°C vs. 43°C.

Abb.10 Wiedergewinnung von initial extrahiertem Insulin aus kontinuierlich bei 37°C (weiße Balken) bzw. hitzebehandelten (graue Balken) Schweineinseln nach 24stündiger Inkubation in NO. (*P<0.05 für 37°C vs. 43°C).

Abb.11 Trypanblauexklusion (%) von unbehandelten und hypertherm vorbehandelten (hitzegeschockten) Inselzellen nach 48stündiger Inkubation in unterschiedlichen Zytokinkombinationen. Der relative Anteil von Trypanblau-negativen Zellen wurde auf die korrespondierenden Werte von unbehandelten (weiße Balken) bzw. hitzegeschockten (graue Balken) Inselzellen ohne Zusatz inflammatorischer Stimuli bezogen. *P<0.05 für 37°C vs. 43°C.

Abb.12 Wiedergewinnung von initial extrahiertem Insulin aus kontinuierlich bei 37°C (weiße Balken) bzw. hitzebehandelten (graue Balken) Schweineinseln nach 48stündiger Inkubation in unterschiedlichen Zytokinkombinationen. (*P<0.05, 37°C vs. 43°C).

Abb. 13 Einfluss von hyperthermen Stress (HS) allein, sowie nach 4stündiger Inkubation mit DEVD vor bzw. nach Hyperthermie (43°C) auf den Anstieg von Bax. *P<0.05 für 37°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

Abb. 14 Einfluss von hyperthermen Stress (HS) allein, sowie nach 4stündiger Inkubation mit DEVD vor bzw. nach Hyperthermie (43°C) auf die Bcl-2 Expression. *P<0.05 für 37°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

Abb.15 Einfluss von hyperthermen (HS) Stress allein, sowie nach 4stündiger Inkubation mit DEVD

vor bzw. nach Hyperthermie (43°C) auf die Caspase-3 Expression. *P<0.05 für 37°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln;
‡P<0.05 für 43°C mit DEVD vor bzw. nach Hyperthermie vs. HS alleine.

Abb.16 Einfluss von hyperthermen (HS) Stress allein, sowie nach 4stündiger Inkubation mit DEVD vor bzw. nach Hyperthermie (43°C) auf die DFF Expression.

*P<0.05 für 37°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln;
‡P<0.05 für 43°C mit DEVD vor bzw. nach Hyperthermie vs. HS alleine.

Abb. 17 Einfluss von hyperthermen (HS) Stress allein, sowie nach 4stündiger Behandlung mit DEVD vor bzw. nach Hyperthermie (43°C) auf die HSP-27 Expression.

*P<0.05 für 37°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln;

‡P<0.05 für 43°C mit DEVD vor Hyperthermie HS alleine.

Abb.18 Einfluss von hyperthermen (HS) Stress allein, sowie nach 4stündiger Inkubation mit DEVD vor bzw. nach Hyperthermie (43°C) auf die HSP-70 (weiße Balken) und HSP-90 (graue Balken) Expression.

*P<0.05 für 37°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln;

‡P<0.05 für 43°C mit DEVD vor Hyperthermie vs. HS alleine.

Abb.19 Einfluss von hyperthermen (HS) Stress allein (graue Balken), sowie nach initialer 4stündiger Behandlung (schwarze Balken) mit NAC auf die Bax und Bcl-2 Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (weiße Balken).

*P<0.05 für 37°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

‡P<0.05 für HS + NAC vs. HS.

Abb.20 Einfluss von hyperthermen (HS) Stress allein (graue Balken), sowie nach initialer 4stündiger Behandlung (schwarze Balken) mit NAC vor HS auf die Caspase-3 und DFF Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (weiße Balken).

*P<0.05 für 37°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

‡P<0.05 für HS vs. HS + NAC.

Abb.21 Einfluss von hyperthermen Stress allein, sowie nach initialer 4stündiger Behandlung mit NAC vor Hyperthermie (43°C) auf die HSP-27 (weiße Balken), -70 (graue Balken) und -90 (schwarze Balken) Expression.

* $P < 0.05$ für 37°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

‡ $P < 0.05$ für HS vs. HS + NAC vor Hyperthermie.

9. Danksagung

Sehr geehrter Prof. Dr. Bretzel, Direktor der Medizinischen Klinik III und Poliklinik des Medizinischen Zentrums für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen, vielen Dank für die Vergabe dieser interessanten Doktorarbeit und Ihre Unterstützung bei der Verwirklichung.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Dr. D. Brandhorst bedanken für seine Unterstützung, Motivation und Zeit, welche er sich genommen hat um diese Arbeit zum Abschluss bringen zu können.

Ebenfalls ganz lieben Dank an die Mitarbeiter der Laboratorien der Medizinischen Klinik III für Ihre Hilfe und Einweisung.

Besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir jederzeit unterstützend zur Seite gestanden haben und auf welche ich mich immer verlassen kann. Ich liebe Euch.

Vielen Dank an meinen Ehemann der mir immer motivierend zur Seite steht und meinen kleinen Bruder. Ihr seid meine besten Freunde.